

Die Rolle des Transkriptionsfaktors HNF1 β und seiner Interaktionspartner während der Nierenentwicklung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geografie

an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von Karin Dudziak
aus Haltern am See

September 2007

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg Essen; Standort Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Ryffel

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2007

Teile dieser Arbeit sind in der Publikation „Interaction partners of the transcription factor HNF1 β that are involved in kidney development“ enthalten. Die Publikation wurde bei der Zeitschrift „Kidney International“ eingereicht.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensine Converting Enzyme
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
3-AT	3-Aminotriazol
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
CAKUT	congenital anomalies of the kidney and urinary tract
DAK	Dihydroxyacetonkinase
DCoH	Dimerization Cofactor of HNF1beta
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis -(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E4F1	E4F transcription factor 1
FCS	Fötales Kälberserum
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
HADH	L-3 hydroxyacyl Coenzym A dehydrogenase
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LPS	Lipopolysaccharid
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MMR	Marc's Modified Ringer
MODY	Maturity onset diabetes of the young
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS-222	Tricain Methansulfonat
mRNA	Messenger-RNA
OD	Optische Dichte
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBST	Tris Buffered Saline, 0,1% Tween 20
TTP	Tristetraprolin
tk	Thymidinkinase
ZFP36L1	Zinkfingerprotein 36 L1

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Eukaryotische Transkriptionsfaktoren	1
1.2	Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 β	2
1.3	Die drei Nierenformen in Vertebraten	7
1.4	Die Pronephrosentwicklung in <i>Xenopus laevis</i>	9
1.5	<i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus	10
1.6	Erbliche Anomalien der Niere und der Harnwege.....	11
1.7	Zielsetzung.....	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Chemikalien, Puffer und Enzyme	13
2.2	Molekularbiologische Standardmethoden	13
2.3	Plasmide.....	13
2.3.1	Konstruktion der Plasmide pCS2+mt-HNF1aaa8+9b und pCS2+mt-HNF1.....	13
2.4	Suche nach Interaktionspartnern von HNF1 β mit dem BacteriomatchII-Two-Hybrid-System	14
2.4.1	Integration von HNF1aaa und HNF1bbb in den Vektor pBT	14
2.4.2	Nachweis der λ -cl-HNF1-Fusionsproteine	14
2.4.3	Durchführung der Interaktionspartnersuche	15
2.5	Klonierung der Interaktionspartner in pCS2+mt	15
2.6	Untersuchung der Interaktionen in vitro	16
2.6.1	GST pull down Analysen.....	16
2.6.2	Western Blotting zum Nachweis der Interaktionspartner	17
2.6.3	Coomassie-Färbung	17
2.6.4	Ponceau-S Färbung der Nitrozellulosemembran	18
2.7	Funktions- und Expressionsanalysen von Proteinen in <i>Xenopus laevis</i>	18
2.7.1	Haltung, in vitro Befruchtung und Kultur der Embryonen des Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i>	18
2.7.2	In vitro Synthese von mRNA.....	19

2.7.3	Injektion der Embryonen	19
2.7.4	Immunfluoreszenz der Pronephri in <i>Xenopus laevis</i> Larven	20
2.7.5	Statistische Auswertung.....	20
2.7.6	Nachweis der überexprimierten Proteine in <i>Xenopus</i> Embryonen.....	21
2.7.7	Whole mount in situ Hybridisierung von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen.....	21
2.8	Zellbiologische Methoden	22
2.8.1	Zellkultur von Flp-In T-Rex-HEK293- Zellen (Invitrogen).....	22
2.8.2	Lokalisationsexperimente von HNF1 β und E4F1 oder ZFP36L1 in HEK 293 Zellen	22
2.8.3	Transiente Transfektion und Luciferase-Reporteranalysen	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Funktion der Homeodomäne von HNF1 β in der Nephrogenese	25
3.2	Suche nach nierenspezifischen Interaktionspartnern von HNF1 β	30
3.2.1	Expression der Fusionsproteine λ -cl-HNF1aaa und λ -cl-HNF1bbb in E. coli XL1 Blue.....	32
3.2.2	Die Köderproteine λ -HNF1bbb und λ -HNF1aaa können die Reportergene nicht selbst aktivieren	33
3.2.3	Bacteriomatch-Two-Hybrid Suche von HNF1bbb-Interaktionspartnern	34
3.2.4	Identität der sequenzierten Interaktionspartner.....	36
3.2.5	Bestätigung von vier Interaktionspartnern in vitro mittels GST-Pull-down Analysen	39
3.2.6	Wirkung der Interaktionspartner auf die Nephrogenese in <i>Xenopus laevis</i>	41
3.2.7	Whole mount in situ Hybridisierung von E4F1 und ZFP36L1	45
3.2.8	Zelluläre Lokalisation von HNF1 β und den Interaktionspartnern E4F1 oder ZFP36L1	47
3.2.9	Beeinflussung des HNF1 β -Transaktivierungspotentials durch die Interaktionspartner E4F1 und ZFP36L1	48
4	Diskussion	51
4.1	Die Rolle der Homeodomäne von HNF1 β während der Nephrogenese	51
4.2	Suche nach Interaktionspartnern von HNF1 β	55
4.2.1	Identifikation von HNF1bbb Interaktionspartnern mit dem Bacteriomatch-II-Two-Hybrid-System	55
4.2.2	Spezifität der Interaktionen.....	56
4.2.3	Der Interaktionspartner HADH	56

4.2.4 Der Interaktionspartner TRIM26	58
4.2.5 Der Interaktionspartner E4F1	59
4.2.6 Der Interaktionspartner ZFP36L1	60
4.2.7 HNF1 β , E4F1 und ZFP36L1 in der Metanephrosentwicklung	63
5 Zusammenfassung	67
6 Literaturverzeichnis	69
7 Danksagung	77

1 Einleitung

1.1 Eukaryotische Transkriptionsfaktoren

In mehrzelligen Organismen mit verschiedenen Zelltypen übernimmt jeder Zelltyp eine für ihn spezifische Aufgabe. Dazu benötigt er eine spezielle Ausstattung von Proteinen. Während beispielsweise in Muskelzellen die Proteine Aktin und Myosin die Muskelkontraktion ermöglichen, findet man in den Zellen der Magenschleimhaut Proteine in Form von Ionenpumpen und Ionenkanälen, die für die Synthese der Salzsäure benötigt werden (Klinke und Silbernagl, 1994). Um die für einen Zelltyp typisches Proteinmuster zu erlangen, wird die Genexpression für jedes Gewebe spezifisch reguliert. Dies wird auch als differentielle Genregulation bezeichnet. Diese ist nicht nur für die spezifische Funktion von Zellen eines Gewebes verantwortlich, sondern auch für den Fortgang der Embryonalentwicklung (Biggin und Tjian, 1989; Kessel und Gruss, 1990; Melton 1991).

Für die Genexpression in Eukaryoten sind verschiedene Faktoren von Bedeutung. Die RNA-Polymerase entwindet die doppelsträngige DNA und synthetisiert die mRNA, die als Matrize für die Herstellung des kodierten Proteins dient. Zur Steuerung ihrer Aktivität benötigt die RNA-Polymerase Transkriptionsfaktoren. Es gibt zwei Arten von Transkriptionsfaktoren: Zum einen gibt es allgemeine Transkriptionsfaktoren (Buratowski 1994). Diese werden für jede Transkription benötigt und sind Bestandteil des Initiationskomplexes. Sie sind ubiquitär vorhanden. Im Gegensatz dazu gibt es spezifische Transkriptionsfaktoren. Diese sind gewebsspezifisch, d. h. sie sind nur in den Zellen vorhanden, in denen das Gen, dessen Expression sie regulieren sollen, eine Rolle spielt. Sie vermitteln der RNA-Polymerase, welches Gen wie stark exprimiert werden soll. Spezifische Transkriptionsfaktoren binden an Erkennungssequenzen im Promotor des zu regulierenden Gens. Diese DNA-Abschnitte werden als cis-Elemente bezeichnet. Es gibt Enhancer, die die Transkription verstärken, und Silencer, die die Transkription vermindern. Ein Promotor kann gleichzeitig mehrere Transkriptionsfaktoren binden. Diese können untereinander durch Protein-Protein-Interaktionen wechselwirken, oder auch mit weiteren Coaktivatoren bzw. Repressoren interagieren. All diese Faktoren bilden zusammen mit der Transkriptionsmaschienerie einen Multiproteinkomplex, durch den die Synthese der mRNA gesteuert wird (Pabo und Sauer, 1992; Giordano und Avantaggiati, 1999; Goodman and Smolik, 2000; Klug 1999). In jedem Zelltyp werden durch spezifische Transkriptionsfaktoren verschiedene Gene aktiviert oder reguliert.

Um als solche funktionieren zu können, müssen die Transkriptionsfaktoren verschiedene Aufgaben erfüllen. Dazu besitzen sie verschiedene Proteindomänen. Eine Domäne ist in jedem Transkriptionsfaktor für die Bindung an die DNA verantwortlich. Anhand dieser Domäne werden die Transkriptionsfaktoren in Helix-turn-Helix,- Helix-loop-Helix, Zinkfinger, Leucinezipper- und Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren klassifiziert (Pabo und Sauer, 1992).

Die Transaktivierungsdomäne ist für die Aktivierung der Transkription des zu regulierenden Gens zuständig. Außerdem können Transkriptionsfaktoren eine Dimerisierungsdomäne besitzen, falls sie als Homo-oder Heterodimer an die DNA binden. Es gibt außerdem Ligandenbindungsdomänen, an denen beispielsweise Steroidhormone binden, die die Transkription des Zielgens aktivieren können.

1.2 Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 β

HNF (Hepatocyte Nuclear Factor) 1 β wurde erstmalig in dedifferenzierten Hepatomazelllinien der Ratte durch Bindung an den Albuminpromotor entdeckt (Cereghini et al., 1988). Er wird in der Leber (Bach et al., 1991), Bauchspeicheldrüse, dem Darm, im Genitaltrakt sowie in der Niere exprimiert (Blumenfeld et al., 1991; Coffinier et al., 1999a). HNF1 β ist vom Zebrafisch bis zum Menschen hoch konserviert (Deryckere et al., 1995; Sun and Hopkins, 2001; Demartis et al., 1994; Frain et al., 1989). Er wird mit dem eng verwandten Transkriptionsfaktor HNF1 α aufgrund der hohen Homologie in eine Proteinfamilie gruppiert. Von beiden sind drei Splice-Varianten bekannt (Bach und Yaniv, 1993). und gehören zu den Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren (Gehring et al., 1994). Die Tertiärstruktur der Splicevarianten A ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

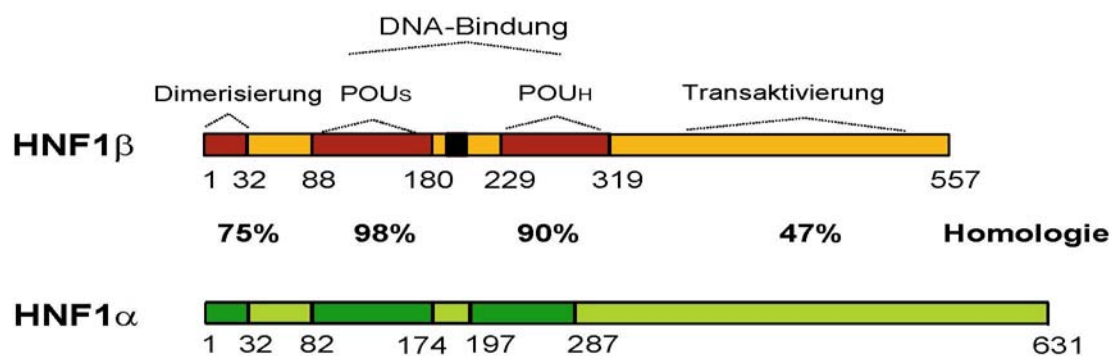


Abb. 1: Schematische Darstellung der Tertiärstruktur von HNF1 β und HNF1 α . POU_S ist die POU spezifische Domäne, POU_H ist die POU Homeodomäne. Der grüne Abschnitt steht für 26 Aminosäuren, die ausschließlich in Splicevariante A von HNF1 β zu finden sind. Die Zahlen markieren die Aminosäurepositionen, an denen eine Domäne beginnt oder endet. Die Homologie ist in Prozent angegeben. (Modifiziert nach Bach und Yaniv, 1993; Cereghini et al., 1996).

Am N-terminalen Ende befindet sich bei beiden Proteinen die Dimerisierungsdomäne. Sie besteht aus vier α -Helices (Rose et al., 2000; Narayana et al., 2001). Durch sie können HNF1 α und HNF1 β als Homodimere oder als Heterodimere an die DNA binden (Mendel et al., 1991). Beide binden an die gleiche DNA-Sequenz. Die POU-Domänen sind an der DNA-Bindung beteiligt. Sie sind die am höchsten konservierten Domänen, wie die Homologie in Abb.1 zeigt. Die Transaktivierungsdomänen unterscheiden sich am stärksten. HNF1 α und HNF1 β haben die gleiche Struktur, allerdings enthält die Splice Variante A von HNF1 β 26 zusätzliche Aminosäuren zwischen der POU-spezifischen und der POU Homeodomäne, die einen „Loop“ bilden. Sie sind in keiner Splicevariante von HNF1 α zu finden.

Heterozygote Mutationen von HNF1 β im Menschen bedingen verschiedene Fehlentwicklungen der Niere. Bekannte Nierenanomalien von Mutationsträgern sind das Fehlen einer Niere, renale Hypoplasie, renale Dysplasie, hyperurikämische Nephropathie und Zystenbildung (zusammengefasst in Edghill et al., 2006). Eine Nierendysplasie zeichnet sich dadurch aus, dass das Nierenmesenchym nur teilweise oder gar nicht zu Nephronen differenziert ist. In diesem Fall ist die Filtrationsleistung nur schwach oder gar nicht vorhanden. Bei der Hypoplasie findet man eine signifikante Reduktion der Anzahl der Nephrone. Weitere Auswirkungen von HNF1 β Mutationen sind MODY5 (maturity onset diabetes of the young) (Horikawa et al., 1997), Hypoplasie der Bauchspeicheldrüse (Haumaitre et al., 2006), Fehlbildungen des Genitaltrakts (Lindner et al., 1999), Gicht und fehlerhafte Leberfunktionen (Bellanne-Chantelot et al., 2004; Beckers et al 2007). Die gleiche Mutation verursacht dabei in verschiedenen Individuen unterschiedliche Phänotypen. Das kann auf ein unterschiedliches Mikromilieu während der Embryonalentwicklung im Mutterleib zurückzuführen sein, da die Menge maternalen Proteins die Genexpression während der Nierenentwicklung im Embryo beeinflusst (Welham et al., 2005).

Da heterozygote Deletionen die gleichen Phänotypen verursachen wie Mutationen (Eller et al., 2007; Bellanne-Chantelot et al., 2005), sind die auftretenden Fehlbildungen- und funktionen anscheinend von der Dosis des nicht mutierten HNF1 β -Proteins abhängig. Heterozygote Mutationen des eng verwandten Transkriptionsfaktors HNF1 α führen im Menschen zu MODY3 (Maturity Onset Diabetes of the Young) und zu einem niedrigen Glukose-Schwellenwert (Pontoglio et al., 2000). Nierendefekte sind bei HNF1 α -Mutationen jedoch nicht beobachtet worden (Ryffel 2001).

Durch die Verwendung von Tiermodellen konnten weitere Informationen über die Funktion von HNF1 β und HNF1 α gewonnen werden. Mäuse, die für HNF1 β oder HNF1 α eine

heterozygote Deletion trugen, entwickelten sich normal (Coffinier et al., 1999; Dukes et al., 1998; Pontoglio et al., 1998; Pontoglio et al., 2000). Nur Mäuse, bei denen HNF1 β oder HNF1 α homozygot deletiert waren (knock out), entwickelten Phänotypen, die den menschlichen Phänotypen sehr ähnlich sind. Während der Embryogenese ist HNF1 β essentiell für die Bildung des visceralen Endoderms (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999b), denn eine homozygote Deletion von HNF1 β in der Maus war vor der Gastrulation letal. Durch Aggregation tetraploider Zellen wurde dieses Problem umgangen. Bei den daraus hervorgehenden Embryonen mit homozygoter HNF1 β Deletion wurde eine Pankreas-Agenese festgestellt (Haumaitre et al., 2004). Bei konditionaler HNF1 β Deletion in den β -Zellen des Pankreas wurde eine verschlechterte Glukose-Toleranz mit reduzierter Insulin-Sekretion beobachtet (Wang et al., 2004). In Mäusen mit einer konditionalen Deletion von HNF1 β in den Nieren wurden Zysten gefunden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass HNF1 β die Expression der Gene UMOD, PKHD1 und PKD2 (Gresh et al., 2004) reguliert. Mutationen dieser Gene sind auch im Menschen für Nierendefekte verantwortlich. Es wurde außerdem gezeigt, dass die C-terminale Domäne von HNF1 β dafür benötigt wird, den Promotor von PKHD1 zu aktivieren (Hiesberger et al., 2005). Diese interagiert mit dem P300/CBP assoziierten Faktor, der für die Aktivierung des Promotors notwendig ist. HNF1 β mit deletierter C-terminaler Domäne wirkt hingegen dominant-negativ auf den PKHD1-Promotor. Durch konditionale HNF1 β Defizienz in den Nieren der Maus wurde gezeigt, dass HNF1 β für die mitotische Zellorientierung entlang der Achse der Tubuli verantwortlich ist (Fischer et al., 2006). Durch konditionale HNF1 β Defizienz in Hepatozyten und den Zellen der Gallengänge zeigte sich, dass HNF1 β für die Morphogenese der Gallengänge essentiell ist (Coffinier et al., 2002). Außerdem reguliert es ein wichtiges Protein in der Fettsäureoxidation, die very long chain acetyl dehydrogenase (VLCAD). Bei HNF1 β Defizienz wird VLCAD reduziert gebildet, und es kommt zu einer Anhäufung von Triglyceriden im Blut. Die homozygote Deletion von HNF1 α in der Maus führt zu Hepatomegalie, Phenylketonurie und dem Fanconi Syndrom, das sich durch das Ausscheiden von Glukose, Phosphat und Aminosäuren über den Urin auszeichnet (Pontoglio et al., 1996). Wie beim Menschen finden sich auch in der Maus keine Fehlbildungen der Nieren.

Im Modellorganismus *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HNF1 β zu einer signifikanten Reduktion der Pronephrosgröße führt, während die Überexpression von HNF1 α keinen Einfluss auf die Pronephrosentwicklung hat (Wild et al., 2000). In Zebrafisch wurden HNF1 β Mutationen als Ursache für Nierenzysten gefunden (Sun

et al., 2004). In Zebrafisch wurde außerdem gezeigt, dass HNF1 β eine Rolle bei der Entwicklung des Nachhirns spielt (Sun und Hopkins., 2001).

Neun HNF1 β -Proteine mit Mutationen, die im Menschen gefunden wurden, wurden auf ihre Fähigkeit, DNA zu binden, auf ihre zelluläre Lokalisation und ihr Transaktivierungspotential getestet. Schließlich wurden die HNF1 β -Mutanten in *Xenopus* überexprimiert. Dies hatte entweder eine Reduktion oder eine Vergrößerung des Pronephros zufolge. Es konnte jedoch keine eindeutige Regelmäßigkeit in Zusammenhang mit den anderen Eigenschaften der Mutanten gefunden werden (Bohn et al., 2003).

Um die Domänen von HNF1 β zu identifizieren, die in *Xenopus laevis* für den Einfluss auf die Pronephrosentwicklung wichtig sind, wurden chimäre Proteine aus HNF1 α und HNF1 β hergestellt und in *Xenopus* überexprimiert. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Dimerisierungsdomäne, als auch die POU Homeodomäne und die 26 zusätzlichen Aminosäuren zwischen den POU Domänen in der Splicevariante A von HNF1 β für die Nephrogenese von Bedeutung sind (Wu et al., 2004).

Die Ergebnisse der Experimente von Wu zur Funktion der Homeodomäne in der Nephrogenese sind in Abb.2 dargestellt. Die Überexpression von HNF1 β oder der verkürzten Mutante Y352insA, die als HNF1bbb bezeichnet wird, bewirkte eine Reduktion der Pronephrosgröße. Ein entsprechend verkürztes HNF1 α -Protein, HNF1aaa, beeinflusste die Nephrogenese nicht. Ein chimäres Protein, HNF1aab, das die Dimerisierungsdomäne und die POU-Domäne von HNF1 α beinhaltete, sowie die Homeodomäne und ein kurzes Stück der Transaktivierungsdomäne von HNF1 β , bedingte bei Überexpression in *Xenopus*-Embryonen eine Reduktion der Pronephrosgröße. Außerdem störte die Überexpression dieses Konstruktes die Embryogenese. Die Zellen des injizierten Bereichs starben z. T. ab, was zu Fehlbildungen oder zum Tod der Embryonen führte. Sowohl die Reduktion der Pronephrosgröße als auch die Störung der Embryogenese waren auch noch dann zu beobachten, wenn die Transaktivierungsdomäne komplett deletiert war (HNF1aabH). Wurden von diesem chimären Protein außerdem die C-terminalen acht AS der Homeodomäne von HNF1 β deletiert (HNF1aabHS), so ging die Wirkung auf die Nephrogenese verloren und die Embryonen entwickelten sich normal. Diese acht Aminosäuren waren also von entscheidender Bedeutung für die Funktion von HNF1 β in bezug auf die Nephrogenese. Die Überexpression der Homeodomäne allein hatte keine Wirkung.

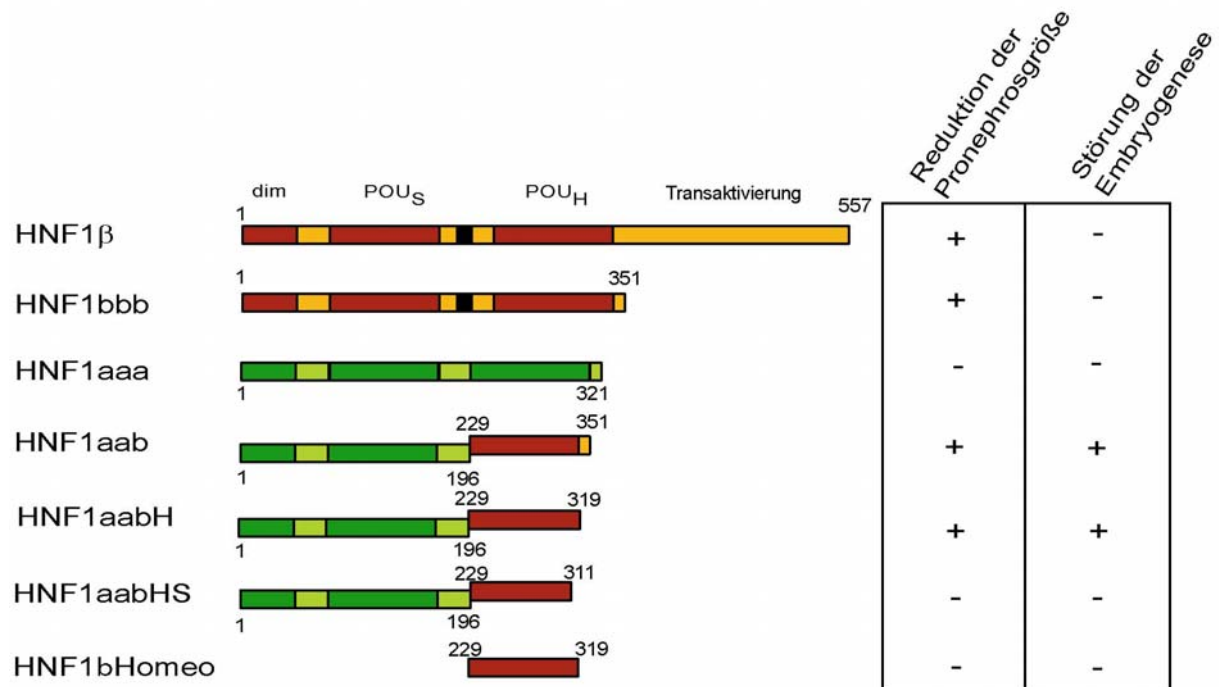


Abb. 2: Wirkung überexprimierter HNF1-Proteine auf die Pronephrosgröße und der Embryogenese in *Xenopus laevis* (modifiziert aus Wu et al., 2004). Die links schematisch dargestellten HNF1-Proteine wurden mit GFP in ein Blastomer des Zweizellstadiums in *Xenopus laevis* Embryonen injiziert. Die freischwimmenden Larven wurden in Stadium 45 fixiert und die Pronephrosgröße auf der injizierten und nicht injizierten Seite gemessen und verglichen. Die roten und orangenen Bereiche markieren HNF1 β -Domänen, die dunkel- und hellgrünen markieren HNF1 α -Domänen. dim: Dimerisierungsdomäne, POU_S: POU spezifische Domäne, POU_H: POU Homeodomäne.

Bei genauerer Betrachtung der Sequenz der Homeodomänen von HNF1 α und HNF1 β ist festzustellen, dass sich die Domänen nur in neun Aminosäuren unterscheiden (Abb. 3). Die POU Homeodomäne besteht aus drei α -Helices, die als Besonderheit einen „Loop“ zwischen der zweiten und der dritten Helix beinhaltet (Ceska et al., 1993, Schott et al., 1997). Die POU spezifische Domäne besteht aus fünf α -Helices (Chi et al., 2002). Beide Domänen berühren sich an bestimmten Aminosäurepositionen und stabilisieren dadurch die Molekülstruktur.

Die neun Aminosäureaustausche der Homeodomänen von HNF1 α und HNF1 β sind nicht auf einen bestimmten Bereich konzentriert, sondern sowohl in den α -Helices als auch in den übrigen Bereichen der Homeodomäne zu finden. Die AS Q250 und Q252 sind in HNF1 α an der stabilen Verbindung zwischen der POU-spezifischen und der POU-Homeodomäne in HNF1 α beteiligt. In der Homeodomäne von HNF1 β befinden sich an diesen Positionen die Aminosäuren Lysin und Histidin. Die Injektion chimärer Konstrukte von HNF1 α und HNF1 β hat gezeigt, dass die neun β -typischen Aminosäuren in der Homeodomäne in einem HNF1 α -Protein ausreichend sind, um die biologische Funktion von HNF1 β in Bezug auf die Nephrogenese herzustellen (Abb. 2, HNF1aabH).

Die Niere mit dem einfachsten Aufbau im Reich der Vertebraten ist der Pronephros. Er ist die funktionelle Niere der aquatisch lebenden Larven von Fischen und Amphibien. Er besteht aus nur einem Nephron, das in drei Elemente gegliedert ist (Abb. 4 links).

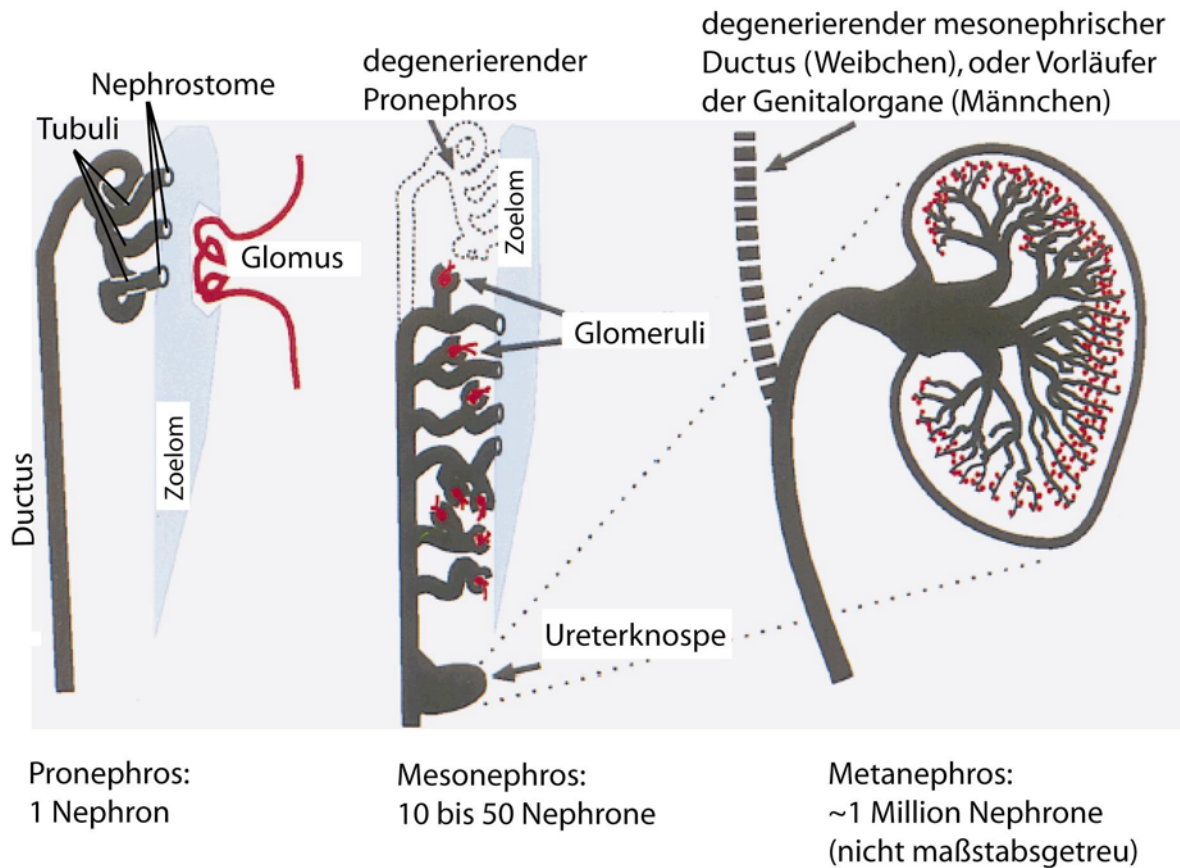


Abb. 4: Die drei Nierenformen der Vertebraten. (Modifiziert nach Vize, 1997).

Der Glomus ist die vaskuläre Filtrationseinheit des Pronephros. Durch ihn wird das Blut gepresst, und es entsteht der Primärharn. Der Primärharn gelangt ins Zoelom. Ins Zoelom münden drei Nephrostome, die Wimperntrichter besitzen. Diese sind mit Cilien besetzt und fördern durch den Cilienschlag den Transport des Primärharns in die Tubuli. Dort findet die Reabsorption von Ionen und wichtigen Makromolekülen statt. Die übrige Flüssigkeit wird durch den Ductus zur Cloake geführt und ausgeschieden. Die zweite Nierenform, der Mesonephros, besteht aus 10 bis 50 Nephronen (Abb. 4 Mitte). Er ist die funktionelle Niere in den adulten niederen Vertebraten, bei Säugern und Vögeln ist er nur während der Embryogenese aktiv. Die komplexeste und leistungsfähigste Nierenform ist der Metanephros. Er enthält eine Million Nephronen und verfügt über einen komplexen Aufbau (Abb. 4 rechts). Er ist die funktionelle Niere adulter Vögel und Säugetiere.

Der Pronephros eignet sich besonders für die Erforschung elementarer Ereignisse in der Nierenentwicklung, denn für die Entstehung des Metanephros spielen die gleichen Moleküle

eine Rolle (Ryffel 2003, Jones 2005). Dazu zählt z. B. HNF1 β , dessen Überexpression eine Reduktion der Pronephrosgröße verursacht, während er, wie oben erwähnt, bei Mutationen in der Entwicklung des Metanephros verschiedene Phänotypen hervorbringt. Pax2-Mutationen verursachen beim Menschen das Renal-Coloboma-Syndrom (Amiel et al., 2000). Bei Überexpression in *Xenopus* konnte eine Vergrößerung des Pronephros beobachtet werden, sowie ektopische Tubuli. Der Faktor Lim1, welcher bereits im frühen Neurulastadium in der Pronephrosanlage in *Xenopus* exprimiert wird, führt bei Überexpression zu einer Vergrößerung des Pronephros und ektopischen Tubuli. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass Lim1 sowohl für die Bildung der Ureterknospe wichtig ist als auch für die Bildung der Nephrone (Kobayashi et al., 2005).

1.4 Die Pronephrosentwicklung in *Xenopus laevis*

Der Pronephros entwickelt sich innerhalb von fünf Tagen aus dem intermediären Mesoderm. Die Spezifizierung des Mesoderms zu Vorläuferzellen des Pronephros beginnt in der frühen Neurulation, Stadium 11/12 (Niewkoop und Faber, 1975). Die Pronephrosanlage ist anhand der Expression einiger wichtiger Pronephrosmarker zu erkennen. Dazu zählen Osr1+2, (Tena et al., 2007) HNF1 β , Lim1 und Pax8 (Ryffel 2003). Veränderungen im Gewebe sind erst im späten Neurulastadium (21) zu beobachten. Das Mesoderm unter den Somiten 3 bis 5 beginnt sich durch Veränderungen der Zellformen zu verdicken. In Stadium 27 sind die Zellen radial angeordnet. In den freischwimmenden Larven teilt sich diese Anlage in Tubuli und Ductus auf (Stadium 30 bis 38). Der Glomus entwickelt sich erst ab dem Stadium 30. Ein Markerprotein des Glomus ist Wilms Tumorfaktor 1 (Wt1), der bereits in der späten Neurula exprimiert wird. Neben den oben genannten Transkriptionsfaktoren spielen noch Proteine des Notch-Signalweges (delta1, serrate1 und Notch1) und des Wnt-Signalweges (Wnt4 und frizzled3) bei der Entwicklung der Tubuli eine Rolle. Ihre Expression beginnt im späten Neurulastadium (Ryffel 2003). Im Ductus beginnt zu diesem Zeitpunkt die Expression der Transkriptionsfaktoren Pax2, Id-2 und POU2. Im Schwanzknospenstadium beginnt die Expression von HNF1 α und ets-2 und Iro-3. In der freischwimmenden Larve in Stadium 30 werden Natrium-Kalium-ATPasen exprimiert, sowie der Glukose-Cotransporter SGLT-1L und der Chlorid-Ionenkanal CLC-K. Diese Moleküle benötigt der Pronephros für seine Reabsorptionsfunktion. In der Glomusanlage beginnt zu diesem Zeitpunkt die Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor). Im Stadium 38 ist der Pronephros schließlich ausdifferenziert.

1.5 *Xenopus laevis* als Modellorganismus

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* gehört zur Gattung der zungenlosen Frösche (Pipidae). Er stammt aus Mittel und Südafrika und lebt aquatil. Er wird seit Jahren als Modellorganismus zur Erforschung entwicklungsbiologischer Prozesse benutzt. Daher sind viele Methoden gut etabliert (s. u.). Gegenüber höher entwickelten Vertebraten verfügt er über viele Vorteile. Er ist in Aquarien einfach zu halten und zu züchten. Durch Injektion von Choriongonadotropin legen die Weibchen bis zu 3000 Eier. Diese Eiablage kann alle drei Monate induziert werden. Durch *in vitro* Fertilisation können die Eier einfach befruchtet werden. Sie haben etwa die Größe eines Stecknadelkopfes und sind daher leicht zu manipulieren. Die Embryonen entwickeln sich außerhalb der Mutter in einer einfachen Salzlösung oder in Wasser. Die Organentwicklung lässt sich gut beobachten, denn die Larven sind transparent.

Um bestimmte Proteine überzuexprimieren, wird ihre kodierende RNA *in vitro* hergestellt und in eine oder mehrere Blastomere des sich entwickelnden Embryos injiziert (Sive et al., 2000). Die Auswahl der Blastomere bestimmt dabei, in welchen Teilen des Embryos das Protein exprimiert wird. Um diese Teile sichtbar zu machen, wird als Markierung z. B. RNA für das grün fluoreszierende Protein (GFP) mit injiziert. Die GFP-Fluoreszenz ist bereits im Blastulastadium zu sehen. Die injizierte RNA ist allerdings nicht dauerhaft stabil, sodass nach einigen Tagen kein Protein mehr überexprimiert wird.

Umgekehrt kann die Expression von Genen durch Injektion synthetisch hergestellter Nukleinsäuren, der Morpholino-Oligonukleotide, gehemmt werden. Dazu ist es jedoch erforderlich, die *Xenopus*-spezifische DNA-Sequenz des Gens zu kennen, um die *xenopus*spezifischen komplementären Morpholino-Oligonukleotide herzustellen. Um festzustellen, in welchen Geweben und zu welchem Zeitpunkt in der Entwicklung bestimmte Gene exprimiert werden, eignen sich die *Xenopus*embryonen besonders zur Whole mount *in situ* Hybridisierung. Die Entwicklungsstadien sind nach Nieuwkoop und Faber eingeteilt und leicht zu bestimmen. Außerdem kann mit Hilfe der Whole mount *in situ* Hybridisierung nach der Überexpression oder Hemmung eines Gens untersucht werden, welchen Einfluss dieser Eingriff auf die Expression anderer Gene hat. Unter erheblich größerem Aufwand ist es außerdem möglich, transgene *Xenopus* herzustellen, bei denen das Transgen stabil ins Genom integriert ist und konditional aktiviert werden kann. Dadurch kann die Funktion eines Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung getestet werden (Jones 2005). Auch Transplantationsexperimente und die Induktion von Gewebeentwicklung anhand animaler

Kappen sind mit *Xenopus*-Embryonen etabliert. Durch Zugabe von Activin A und Retinsäure zu animalen Kappen kann beispielsweise die Entwicklung von Pronephros-gewebe induziert werden (Asashima et al., 2000).

Anhand solcher Experimente konnten schon die Rollen vieler Schlüsselmoleküle der Entwicklung charakterisiert werden, z. B. die Rolle des Wnt-Signalweges während der Entwicklung (Kühl 2002).

1.6 Erbliche Anomalien der Niere und der Harnwege

Der Metanephros ist die direkte Vorstufe der Niere. Seine Entwicklung im menschlichen Foetus beginnt in der fünften Woche nach der Befruchtung. Die Ureterknospe wächst vom Wolffschen Gang aus in das renale Mesenchym und verzweigt sich dabei viele Male. An den Spitzen der Verzweigungen induziert er die Verdichtung des renalen Mesenchyms und die Entwicklung der Nephrone aus den verdichteten Zellen. Die Ureterknospe selbst bildet die Sammelrohre und den Ureter. Werden diese frühen Ereignisse der Nierenentwicklung gestört, so resultieren daraus eine Reihe von Fehlbildungen wie das völlige Fehlen einer Niere, Dysplasie oder Hypoplasie, sowie Anomalien der Harnwege. Diese Fehlbildungen werden zusammengefasst als „congenital anomalies of the kidney and urinary tract (=CAKUT)“ (Woolf 2006). CAKUT ist in 40% der Kinder mit chronischer Niereninsuffizienz oder Nierenversagen der Grund dieser Erkrankung. Bei einem von 200 Neugeborenen wird per Ultraschalluntersuchung eine solche Fehlbildung entdeckt (Weber et al., 2006). Diese sind häufig mit anderen Anomalien assoziiert. In der Datenbank OMIM sind mehr als 100 CAKUT Syndrome beschrieben, von denen bei vielen der genetische Hintergrund nicht geklärt ist (Woolf 2006).

Zu den bekannten CAKUT-Genen gehören eyes absent 1 (EYA1), sine oculis 1 (SIX1), paired box 2 (PAX2), SALL1 und HNF1 β . Mutationen dieser Gene führen zu verschiedenen Syndromen mit Nierenfehlbildungen. Bei 70-90% der Patienten ist jedoch nicht bekannt, welches fehlerhaft exprimierte Gen für die Fehlbildung verantwortlich ist (Weber et al., 2006; Ulinski et al., 2006).

1.7 Zielsetzung

Die Homeodomäne von HNF1 β ist eines der drei Strukturelemente, die in *Xenopus laevis* die Nephrogenese beeinflussen (Wu et al., 2004). Sie unterscheidet sich von der HNF1 α Homeodomäne nur in neun Aminosäuren. HNF1 α hat keinen Einfluss auf die Nierenentwicklung. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Homeodomäne von HNF1 β ihre Wirkung auf die Nierenentwicklung auch dann noch behält, wenn einige der HNF1 β typischen Aminosäuren gegen HNF1 α typische ausgetauscht werden und ob sich der Effekt auf eine einzige Aminosäure reduzieren lässt.

Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 β zählt zu der Gruppe von Genen, die bei Mutationen Fehlbildungen der Niere verursachen (CAKUT-Gen, congenital anomalies of the kidney and urinary tract). Derartige Fehlbildungen werden bei etwa einem von 200 Neugeborenen gefunden, doch in den meisten Fällen kann keine Mutation in den bekannten CAKUT-Genen gefunden werden. Ziel dieser Arbeit war es, weitere Kandidaten zu identifizieren, die als CAKUT-Gene infrage kommen. Um dieses Ziel zu erreichen, sollte nach Interaktionspartnern von HNF1 β während der Entwicklung der Niere gesucht werden, da es anzunehmen ist, dass andere Transkriptionsfaktoren, die zur Nierenentwicklung beitragen, im Multiproteinkomplex der Transkriptionsmaschienerie mit HNF1 β interagieren oder dass es Cofaktoren sind, die die Aktivität von HNF1 β beeinflussen. Um die Interaktionspartner zu finden, sollte eine humane foetale Nieren-cDNA-Bank benutzt werden. Die Interaktionen sollten anschließend *in vitro* überprüft werden. Um einschätzen zu können, ob die gefundenen Protein-Protein- Interaktionen biologisch relevant sind, sollten die Interaktionspartner in *Xenopus laevis* überexprimiert und seine Wirkung auf die Entwicklung des Pronephros untersucht werden. Durch Whole mount *in situ* Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen sollte geklärt werden, ob die Interaktionspartner mit biologischer Funktion in der Pronephrosanlage exprimiert werden. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, ob diese Interaktionspartner mit HNF1 β in humanen embryonalen Nierenzellen im gleichen Zellkompartiment lokalisiert sind und ob sie gegenseitig ihre Lokalisation beeinflussen. Durch Luciferase-Reportersysteme sollte des Weiteren getestet werden, ob die Interaktionspartner das Transaktivierungspotential von HNF1 β beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p. a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Lösungen und Puffer, deren Zusammensetzung nicht anders vermerkt ist, wurden nach den Protokollen der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989) hergestellt. Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme für DNA und RNA stammten von den Firmen Biolabs (Schwalbach), Invitrogen (Karlsruhe), Pharmacia (Freiburg) und Roche (Mannheim).

2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Techniken wie Anzucht von Bakterien, Plasmid-DNA-Präparationen, Modifikation von DNA und Gelelektrophoresen wurden nach Sambrook et al. 1989 durchgeführt. Die Aufreinigung großer Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Nucleobond PC 500 Kit“ von Macherey-Nagel (Düren).

2.3 Plasmide

2.3.1 Konstruktion der Plasmide pCS2+mt-HNF1aaa8+9b und pCS2+mt-HNF1

Als Ursprungskonstrukte wurden die Plasmide pCS2+mt-HNF1aabH und pCS2+mt-HNF1aaa (Wu et al., 2004) benutzt. Die HNF1-Konstrukte wurden über die Schnittstellen EcoRI und XbaI in pBSK+ umklont. Das Restriktionsenzym AccI schneidet in den Homeodomänen von HNF1 α und HNF1 β an der gleichen Stelle, nämlich zwischen den Aminosäureaustauschen sieben und acht, sowie im pBSK+ vor der MCS. Die beiden Plasmide wurden mit AccI restringiert und die kleinen Fragmente mit den großen Fragmenten des anderen Restriktionsansatzes ligiert, sodass HNF1-Konstrukte mit den β -spezifischen Aminosäuren 1-7 oder 8+9 entstanden. Die Orientierung wurde durch Restriktion mit den Enzymen EcoRI und XbaI überprüft. Die neuen HNF1-Konstrukte wurden via EcoRI und XbaI in den Vektor pCS2+mt kloniert.

Die Konstruktion weiterer Plasmide ist den Methoden zugeordnet, für deren Anwendung sie gebraucht wurden.

2.4 Suche nach Interaktionspartnern von HNF1 β mit dem BacteriomatchII-Two-Hybrid-System

2.4.1 Integration von HNF1aaa und HNF1bbb in den Vektor pBT

Das BacteriomatchII-Two-Hybrid-System von Stratagene (Amsterdam) wurde zur Suche von HNF1 β Interaktionspartnern benutzt. Ein verkürztes HNF1 β -Protein AS 1-352, im folgenden als HNF1bbb bezeichnet (Wu et al., 2004) sowie das entsprechend verkürzte HNF1 α -Protein, AS 1-321, im folgenden als HNF1aaa bezeichnet (Wu et al., 2004) wurden in den Bait-Vektor pBT integriert: Zunächst wurde ein Linker in die MCS eingebaut: Die Oligonukleotide 5'-CCGGGGATCCACTAGTC-3' und 5'-TCGAGACTAGTGGATCC-3' wurden durch Erhitzung auf 95°C und langsames Wiederabkühlen auf Raumtemperatur dimerisiert, und mittels Benutzung der Schnittstellen XmaI und XhoI in den pBT-Vektor eingefügt. Um das HNF1bbb-Fragment mit den flankierenden Schnittstellen EcoRI und XbaI (Wu et al., 2004) in den Vektor zu klonieren wurden hierfür die Schnittstellen EcoRI und SpeI benutzt. XbaI und SpeI haben kompatible Enden, die SpeI-Schnittstelle im Linker wurde jedoch durch die Ligation zerstört. Durch die Integration wurde die DNA von HNF1aaa und HNF1bbb mit dem λ -Repressor fusioniert.

2.4.2 Nachweis der λ -cl-HNF1-Fusionsproteine

Um die Expression in *E. coli* mittels Western Blot nachzuweisen, wurden die pBT-HNF1aaa und pBT-HNF1bbb Plasmide in *E. coli* transformiert und die Proteinexpression mit 1mM IPTG induziert. 20 μ l der LB-Flüssigkultur wurden mit Lämmli-Probenpuffer (Lämmli 1970) 4 min bei 95°C aufgekocht und die Proteine im 10% SDS-Polyacrylamidgel (Mini-Protean II-Gele, BioRad) aufgetrennt. Durch Elektrottransfer (Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer-Cell, BioRad) wurden die Proteine bei 1,5 mA/cm² Gel für 1 Stunde in Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell Biosciences, Dassel) übertragen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran 1h bei 4°C in 5% Milchpulver (Applichem) in TBST geblockt.

Um die Proteine anhand der λ -Repressor-Domäne nachzuweisen, folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei RT mit dem polyklonalen Kaninchen-Erstantikörper anti- λ -cl (#240110, Stratagene). Dieser wurde 1:2000 in TBST mit 1% Milchpulver verdünnt. Anschließend wurde 3 x 10 min. mit TBST gewaschen und mit dem 1:5000 in TBST mit 1% Milchpulver verdünnten Zweitantikörper (Peroxidase- gekoppelter Ziege-anti-Kaninchenantikörper, Dianova) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen erfolgte die Detektion des Zweitantikörpers mit dem Enhanced Chemoluminescence-System (ECL-System, Amersham) entsprechend den Herstellerangaben.

Transferpuffer:

48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,04% SDS; 20% Methanol

2.4.3 Durchführung der Interaktionspartnersuche

Die Interaktionspartner wurden in einer humanen foetalen cDNA-Bank gesucht. Diese wurde aus Nierengewebe von fünf männlichen Foeten im Alter von 17-28 Wochen durch die Firma Stratagene hergestellt und in den Bank-Vektor pTRG kloniert (Kat.-Nr. 982264). Die Suche nach Interaktionspartnern wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Abweichend zum Protokoll wurden zur Bestätigung der Interaktion sowie zum Test auf Interaktion mit HNF1aaa und auf Selbstaktivierung nicht die kompetenten E. coli gekauft, sondern es wurden Bakterien des gleichen Stammes mit der Kalzium-Chloridmethode kompetent gemacht und nach Angaben von Stratagene transformiert. Die gefundenen cDNAs wurden mittels PCR amplifiziert, um sie durch Sequenzierung identifizieren zu können. Dazu wurden die von Stratagene vorgegebenen Primer pTRG-forward und pTRG-reverse verwendet. Die Gold-Star Taqpolymerase (Eurogentec, Köln) wurde zur Amplifikation eingesetzt. Die Sequenzierung wurde vom Sequenzierservice der Uniklinik Essen, Institut für Humangenetik, oder im Institut für Zellbiologie durchgeführt. Als Sequenzierprimer wurde der pTRG-forward Primer verwendet.

2.5 Klonierung der Interaktionspartner in pCS2+mt

Die offenen Leserahmen der humanen Interaktionspartner wurden in voller Länge in den Expressionsvektor pCS2+mt integriert und dabei mit einem N-terminalen myc-tag fusioniert. Dazu wurden folgende cDNA-Klone gekauft: E4F1: MHS 1011-98054328 (Open

Biosystems); HADH: IRAUp969E0716D6 (RZPD); DAK: IRATp970A075D6 (RZPD); TRIM26: EHS 1001-44147 (Open Biosystems); ZFP36L1: IRATp970B0216D6 (RZPD)

Die HADH Isoform 2 wurde nicht angeboten, daher wurde auf die short form zurückgegriffen. Mittels PCR wurden Schnittstellen an die offenen Leserahmen angefügt, die zur Klonierung in den Zielvektor benutzt wurden. Diese sind in den Primersequenzen unterstrichen. Für die PCR wurde die Proof-reading Polymerase Pwo (Peglab) benutzt, da ihre Fehlerrate deutlich geringer ist als bei anderen DNA-Polymerasen. Folgende Primer wurden benutzt:

E4F1 forward: 5'-CGGAAATTCATGGAGGGCGCGATG-3',

E4F1 reverse: 5'-CTAGTCTAGACTAGACGATGACCGTCTG-3',

DAK forward: 5'-CGGAAATTCAATGACCTCCAAGAAGCTG;

DAK reverse: 5'-CCGCTCGAGCTAGCTCTGCAAGACCTC-3'

HADH forward: 5'-CGGAAATTCAATGGCCTTCGTCACCAG-3',

HADH reverse: 5'-CCGCTCGAGTCACTTGTATTTGTAAAATCC-3',

TRIM26 forward: 5'-CGGAAATTCAATGGCCACGTCAGCCC-3'

TRIM26 reverse: 5'-CCGCTCGAGTCAGAAGTTCCTCGGG-3',

ZFP36L1 forward: 5'-CGGAAATTCAATGACCACCACCCTCGT-3'

ZFP36L1 reverse: 5'-CCGCTCGAGTTAGTCATCTGAGATGGAAA-3'.

Die Amplifikate wurden über die angefügten Schnittstellen (unterstrichen) in den Vektor pCS2+mt eingebracht und sequenziert. Dazu wurden die Primer SP6 und T7 benutzt.

2.6 Untersuchung der Interaktionen in vitro

2.6.1 GST pull down Analysen

Die offenen Leserahmen von HNF1bbb und HNF1aaa wurden über die Schnittstellen EcoRI und XhoI aus dem pBT-Vektor in den Vektor pGEX4T3 (Amersham Biosciences) kloniert und dadurch auf der N-terminalen Seite mit dem GST-Protein fusioniert. Die Fusionsproteine wurden nach dem Protokoll von Amersham Biosciences in E.coli BL21 hergestellt. Zur Isolierung der Proteine wurden die E.coli BL21 in PBS aufgenommen, sodass das Volumen 1/20 des Kulturvolumens entsprach. Die Bakterien wurden durch sechs mal zehn Sekunden lange Ultraschall-Beschallung lysiert und nach Angaben von Amersham Biosciences an die Glutathione Sepharose 4B Beads gebunden. Die Beladung der Beads mit den

Fusionsproteinen wurde im Coomassie-Gel überprüft. Bevor die Beads zum GST-Pull-down eingesetzt wurden, wurden unspezifische Bindestellen mit 3% BSA in NETN 30 min bei RT abgesättigt. Die Interaktionspartner wurden mit dem SP6-TNT-System von Promega hergestellt und im Western Blot auf vollständige Expression getestet. 10µg von GST-HNF1bbb oder GST-HNF1aaa und die äquimolare Menge von GST wurden mit 5µl der TNT Reaktionsansätze für 1h bei RT in NETN mit dem Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit NETN wurden die Beads mit Laemmli-Probenpuffer für 4 min auf 95°C erhitzt und der Überstand im Western Blot gegen myc getestet.

NETN 20mM Tris HCl pH8, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.4% NP40

2.6.2 Western Blotting zum Nachweis der Interaktionspartner

Die Proben wurden mit 5x Lämmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt 4min bei 95°C erhitzt und in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel (Mini-Protean II-Gele, BioRad) aufgetrennt. Durch Elektrotransfer (Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer-Cell, BioRad) wurden die Proteine bei 1,5 mA/cm² Gel für 1 Stunde in Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell Biosciences, Dassel) übertragen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit 0,5% Blockingreagenz (Liquid block, RPN 3601, Amersham, Braunschweig) in Blocking Puffer geblockt. Um Proteine mittels eines fusionierten myc-tags nachzuweisen, folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei RT mit dem Erstantikörper 9E10 (Evan et al., 1985) der 1:5 in PBS/0,1% Tween 20 verdünnt wurde. Anschließend wurde 3 x 10 min. mit PBS/0,1% Tween 20 gewaschen und mit dem 1:5000 in PBS/0,1% Tween 20 verdünnten Zweitantikörper (Peroxidase- gekoppelter Ratte-Anti-Maus-Antikörper IgG, Dianova) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen erfolgte die Detektion des Zweitantikörpers mit dem Enhanced Chemoluminescence-System (ECL-System, Amersham) entsprechend den Herstellerangaben. Transferpuffer:

48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,04% SDS; 20% Methanol

2.6.3 Coomassie-Färbung

SDS-Polyacrylamidgele werden 30 min bei RT in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend 4h oder über Nacht bei RT in Entfärbelösung inkubiert.

Färbelösung: 0,2% Coomassie Blue R250; 50% Methanol; 7% Eisessig

Entfärbelösung: 5% Methanol; 7,5% Eisessig

2.6.4 Ponceau-S Färbung der Nitrozellulosemembran

Die Nitrozellulosemembranen wurden 5 min bei RT in Ponceau-S Färbelösung inkubiert. In anschließenden Wasserbädern wurde die überschüssige Farbe entfernt.

Ponceau-S-Färbelösung: 0,5% Ponceau S, 1% Eisessig

2.7 Funktions- und Expressionsanalysen von Proteinen in *Xenopus laevis*

2.7.1 Haltung, *in vitro* Befruchtung und Kultur der Embryonen des Krallenfrosches *Xenopus laevis*

Die südafrikanischen Krallenfrösche der Art *Xenopus laevis* wurden von der Firma Xenopus Express, Frankreich bezogen und im zentralen Tierlabor des Essener Uniklinikums unter Standardbedingungen gehalten. Adulte Weibchen wurden durch Injektion von 200-500 Einheiten humanem Chorion-Gonadotropin Pregnesin (Sigma Aldrich) in die dorsalen Lymphsäcke zur Eiablage gebracht. Durch gezielte Massage des Rückens und Bauches konnte eine spontane Eiablage induziert werden. 200-500 Eier wurden in einer Petrischale gesammelt und so verteilt, dass sie als Monolayer vorlagen. Für die *in vitro* Befruchtung der Eier wurde den männlichen Tieren der Hoden unter Betäubung mit 0,5% MS 222 entnommen. Ohne den Hoden zu quetschen wurde ein Stück abgeschnitten. Die Qualität der Spermien konnte nach deren Aktivierung durch Wasserzugabe, anhand ihrer Beweglichkeit mikroskopisch untersucht werden. Mit der Schnittfläche wurde der Hoden über die Eier gerieben. Der Hoden wurde in Holtfreter-Lösung bei 4°C bis zu einer Woche gelagert. 5 min nach der Befruchtung wurden die Eier mit Wasser überschichtet. Durch die nach 20 min einsetzende Kortikalreaktion, bei der sich der pigmentierte animale Pol nach oben dreht, ist eine erfolgreiche Befruchtung erkennbar. Die Gallerthülle wurde nach ca. 45 min. durch eine 2-4 minütige Inkubation in 2% Cystein-Hydrochlorid (Fluka) pH 8 entfernt und danach mehrmals mit Wasser gewaschen.

Die Kultivierung der Embryonen fand in 0,1 x MMR bei 14 – 23°C statt. Die Entwicklungsstadien wurden nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt.

Holtfreter-Lösung:

60 mM NaCl; 0,6 mM KCl; 0,9 mM CaCl₂; 0,2 mM NaHCO₃

1 x MMR:

0,1 M NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 2 mM CaCl₂; 5 mM HEPES (pH 7,8); 0,1 mM EDTA

2.7.2 In vitro Synthese von mRNA

Die *in vitro* Synthese der mRNA wurde nach dem Protokoll von Nielsen und Shapiro (1986) durchgeführt. Es wurden jeweils 3 µg linearisierter Vektor und 100 Einheiten RNA-Polymerase verwendet. Die Konstrukte im pCS2+mt Vektor wurden mit dem Restriktionsenzym NotI (1 Stunde, 37°C) linearisiert, für pCSGFP2 (Amaya) wurde das Restriktionsenzym PvuII (1 Stunde, 37°C) verwendet. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen) gereinigt und mit der SP6-RNA-Polymerase transkribiert. Nach der RNA-Synthese und dem enzymatischen Abbau der DNA (Nielsen and Shapiro 1986) wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe von Phase Lock Gel TM Heavy, (1,5 ml, Eppendorf) nach Herstellerangaben extrahiert. Jeder Ansatz wurde in vier Aliquots aufgeteilt und mit Natriumacetat gefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und in 70% Ethanol bei – 80°C gelagert. Die RNA Konzentration wurde photometrisch ermittelt und die Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.7.3 Injektion der Embryonen

Die in Form des Ethanol-Präzipitats eingefrorene RNA wurde in DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Aqua dest. aufgenommen. Zur Injektion wurden Mikrokapillaren (ø 0,58 mm, World Precision Instruments, Sarasota) unter Verwendung der Injektionsapparatur PicospritzerII (General Valve Corporation, Fairfield) benutzt. In eine Blastomere eines Embryos im Zwei- Zell-Stadium wurden 250 pg mRNA eines Interaktionspartners oder eines modifizierten HNF1-Proteins zusammen mit 100 pg RNA des Green Fluorescence Protein (GFP) in einem Volumen von 10 nl injiziert. Als Kontrolle wurden 100 pg GFP RNA alleine injiziert. Das Injektionsvolumen wurde durch Messen der Tropfengröße bestimmt. Alle Injektionen wurden in einer 2%-Ficoll- Lösung durchgeführt, um ein Auslaufen der Eier an der Eintrittsstelle der Nadel zu verhindern. Nach 2 Stunden wurden die Embryonen in 0,1 x MMR überführt. Im Schwanzknospenstadium wurde die

injizierte Seite anhand der grünen Fluoreszenz bestimmt. Die Larven wurden im Stadium 45 in MEMFA fixiert, in Methanol dehydriert und bei -20°C aufbewahrt.

MEMFA

0,1 M MOPS; 2 mM EGTA; 1 mM MgSO_4 ; 3,7% Formaldehyd

2.7.4 Immunfluoreszenz der Pronephri in *Xenopus laevis* Larven

Für die Immunfluoreszenz wurden die injizierten und fixierten Larven mit PBS rehydriert und mit PBT/10% Ziegenserum für 1 Stunde bei RT geblockt. Danach wurde mit dem Gemisch der beiden Erstantikörpern, 3G8, 1:40 verdünnt und 4A6, 1:4 verdünnt in PBT/10% Ziegenserum über Nacht bei 4°C inkubiert. 3G8 ist ein monoklonaler Mausantikörper, der gegen die terminalen Differenzierungsmarker der Pronephroskanälchen und der Nephrostome gerichtet ist (Vize et al., 1995). 4A6 ist ein monoklonaler Mausantikörper, der gegen die terminalen Differenzierungsmarker des Pronephrosganges und der Nephrostome gerichtet ist (Vize et al., 1995).

Nach fünfmaligem Waschen für je 1,5 Stunden in PBT bei RT, erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 in PBT/10% Ziegenserum verdünnten Cy3 gekoppelten Ratte-Anti-Maus Zweitantikörper (Codennr. 415-166-166, Jackson ImmunoResearch) bei 4°C über Nacht im Dunkeln. Dann erfolgte erneutes Waschen mit PBT bei RT und die Auswertung am Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Leica, Köln).

PBT

PBS; 2 mg/ml BSA (bovine serum albumin, Fraktion 5); 0,1% Triton X-100

Erstantikörper:

Die Antikörper 3G8 und 4A6 wurden freundlicherweise von Dr. E. A. Oliver-Jones (Warwick University, Coventry, England) zur Verfügung gestellt.

2.7.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden von den immunfluoreszierenden Larven eine Größenbestimmung des Pronephroskanals und des proximalen Abschnittes des Pronephrosganges durchgeführt. Diese Strukturen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Kappa Image Base Metro (opto-electronics GmbH, Gleichen) vermessen und der Größenunterschied zwischen injizierter und nicht injizierter Seite berechnet. Kein Größenunterschied wurde gleich 100 gesetzt. Um die Signifikanz der erhaltenen Phänotypen

zu prüfen (p-Wert) wurde zunächst nachgewiesen, dass alle Datenreihen normalverteilt waren. Dazu wurde das Programm GraphPad Prism verwendet. Entsprechend wurde der T-Test benutzt, um die Daten auf signifikante Unterschiede zu testen. Es wurden jeweils die Daten von den Injektionen der HNF1-Konstrukte oder der Interaktionspartner mit den Kontrollinjektionen von GFP alleine verglichen.

2.7.6 Nachweis der überexprimierten Proteine in *Xenopus* Embryonen

Um die Überexpression der Interaktionspartner durch die eingebrachte mRNA in den *Xenopus* Embryonen nachzuweisen, wurde ein Western Blot gegen die N-terminal fusionierten myc-Epitope durchgeführt. Dazu wurden mindestens zwei Embryonen mit grüner Fluoreszenz im Stadium 10 oder später in Lysepuffer zermörsert und unlösliche Bestandteile bei 15000 rpm 15 min bei 4°C (Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge) sedimentiert. Die Proteinkonzentration der Überstände wurde mit dem BioRad Protein-Assay System bestimmt. Es wurden jeweils 12,5µg Protein in 10%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und per Western Blot analysiert.

Lysepuffer: 50 mM Tris (pH 7.9), 25% (v/v) Glycerol, 50 mM KCl, 2mM DTT, 0.1 mM EDTA, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

2.7.7 Whole mount in situ Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen

Die Whole mount in situ Hybridisierung wurde nach dem Standardprotokoll der Cold Spring Harbour Laboratories durchgeführt (Sive et al., 2000). Zur Synthese der Digoxigenin markierten RNA Proben wurde das DIG-RNA-Labeling-Kit (Boehringer, Mannheim) verwendet. Die als Matrize dienenden Plasmide wurden entsprechend der Tabelle 1 mit Restriktionsenzymen linearisiert und mit verschiedenen RNA-Polymerasen als Sense- bzw. Antisense-Probe transkribiert.

Tabelle 1: Übersicht zur Herstellung der sense- und antisense Sonden für die Whole mount in situ Hybridisierung

Probe	Vektor	Restriktionsenzym		RNA-Polymerase		RZPD-Klon	Organismus
		antisense	sense	antisense	sense		
XC3H2	pBSK+	EcoRI	XbaI	T3	T7	IRAK-p961O21159Q	<i>Xenopus laevis</i>
XE4F1	pCS107	ClaI	XhoI	T7	SP6	IRAK-p961C23279Q	<i>Xenopus tropicalis</i>

Für die Farbreaktion, mit der die Anwesenheit der gesuchten Transkripte sichtbar gemacht wurde, wurde das präzipitierende BM Purple AP Substrat (Boehringer, Mannheim) verwendet. Die Embryonen wurden über Nacht bei 4°C und 1h bei 37°C mit dem BM Purple AP Substrat inkubiert und nach Standardvorschrift gebleicht.

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Zellkultur von Flp-In T-Rex-HEK293- Zellen (Invitrogen)

Flp-In T-Rex HEK293 Zellen (Immortalisierte embryonale Nierenzelllinie des Menschen) wurden bei 37°C, 7,2% CO₂ und 95% wassergesättigter Atmosphäre in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (Biochrom), 2 mM L-Glutamin sowie je 100U/ml Penicillin und Streptomycin sowie 100µg/ml Zeocin (Cayla) und 15µg/ml Blasticidin (Cayla) kultiviert. Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden 10⁷ Zellen in 3 ml kaltem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO in DMEM) aufgenommen, in 1 ml Aliquots langsam auf -70°C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Aliquots wurden zum Auftauen langsam auf 37°C erwärmt und in 10 ml vorgewärmtem Medium gewaschen, um das DMSO zu entfernen. Dann wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in 10cm Schalen ausgesät.

2.8.2 Lokalisationsexperimente von HNF1β und E4F1 oder ZFP36L1 in HEK 293 Zellen

Um die Lokalisation von HNF1β und den potentiellen Interaktionspartners E4F1 oder ZFP36L1 zu bestimmen, wurden 300000 HEK 293 Zellen in 6 well Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h transfiziert. Da E4F1 und HNF1β nukleäre Proteine sind, wurden die Zellen mit jeweils 0,9µg pCS2+mt-E4F1 und Rc/CMV-GFP-HNF1β (Wu et al., 2004) transfiziert. Bei ZFP36L1 wurde 0,3µg pCS2+mt-ZFP36L1 und 0,9µg Rc/CMV-GFP-HNF1β und das umgekehrte Verhältnis transfiziert, da erwartet wurde, dass sich die beiden Proteine nicht im gleichen Kompartiment befinden, denn ZFP36L1 ist in 293 Zellen vorwiegend im Cytoplasma zu finden (Phillips et al., 2002). Durch Transfektion unterschiedlicher DNA-Verhältnisse wurde getestet, ob der Überschuss eines Partners Auswirkungen auf die Lokalisation des anderen Partners bewirkt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurde 4% Formaldehyd in PBS

zugegeben und 10 min bei 4°C inkubiert. Es wurde anstelle von Methanol eingesetzt, um die Fluoreszenz von GFP zu erhalten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,25% Triton X 100 in PBS permeabilisiert.

Durch Inkubation mit PBS/10% Ziegen Serum für 1 Stunde bei 4°C wurden unspezifische Bindungen abgesättigt. Der Erstantikörper 9E10 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den myc-tag gerichtet ist (Evan et al., 1985). Er wurde in einer Verdünnung von 1:5 in DMEM auf die Zellen gegeben und 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde mehrmals mit PBS gewaschen und der Cy3 gekoppelte Zweitantikörper (Codennr. 415-166-100, Jackson ImmunoResearch) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/10% Ziegen Serum zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln. Nach erneutem Waschen mit PBS und Trocknen mit einem Zellfasertuch, wurden die fixierten Zellen mit „Mounting-Medium“ (Vectashield, Vector-Laboratories) eingedeckelt und mit konfokaler Mikroskopie (Leica DM IRE2) ausgewertet.

2.8.3 Transiente Transfektion und Luciferase-Reporteranalysen

Als Luciferase-Reporterkonstrukte mit HNF1-Bindestellen wurden die Vektoren OPN-pGL3basic, ACE2-pGL3basic (Senkel et al., 2005) und das artifizielle HNF1⁴-tk-Promotor-Konstrukt (Drewes et al., 1996) verwendet. Rc/CMV-HNF1 β wurde von (Wild et al., 2000) beschrieben. Für den Luciferaseassay wurden Flp-In-T-Rex HEK293-Zellen mit DNA-Mengen nach Angaben der Tabelle 2 (Versuche mit E4F1) und Tabelle 3 (Versuche mit ZFP36L1) transfiziert. Dabei wurden weggelassene Komponenten durch pCS2+mt ohne Insert aufgefüllt.

Tabelle 2: Transfizierte DNA-Mengen in Luciferase-Reporteranalysen zum Einfluss von E4F1 auf das Transaktivierungspotential von HNF1 β

		Rc/CMV-HNF1 β	PCS2+mt-E4F1
OPN-pGL3basic	0,2 μ g	0,4 μ g	1,2 μ g
ACE2-pGL3basic	0,2 μ g	0,4 μ g	1,2 μ g
HNF1 ⁴ -tk-luc	0,2 μ g	0,4 μ g	1,2 μ g

Tabelle 3: Transfizierte DNA-Mengen in Luciferase-Reporteranalysen zum Einfluss von ZFP36L1 auf das Transaktivierungspotential von HNF1 β

		Rc/CMV-HNF1 β	PCS2+mt-ZFP36L1
OPN-pGL3basic	0,1 μ g	0,56 μ g	1,13 μ g
ACE2-pGL3basic	0,1 μ g	0,2 μ g	1,5 μ g
HNF1 ⁴ -tk-luc	0,1 μ g	0,85 μ g	0,85 μ g

Die Transfektion erfolgte in 6-Well-Schalen mit 300000 Zellen pro Well und 6 μ l Lipofektamin (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion in 150 μ l Lysepuffer durch Pipettieren vom Boden abgelöst und aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min. mit 10000 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert und 10 μ l des Überstandes wurden mit Hilfe des „Luciferase Assay Systems“ (Promega) in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) analysiert.

Lysepuffer:

25 mM Trisphosphat (pH 7,8); 2 mM DTT; 2 mM CDTA; 10% Glycerol; 1% Triton-X-100

3 Ergebnisse

3.1 Funktion der Homeodomäne von HNF1 β in der Nephrogenese

In diesem ersten Versuchsteil sollte die POU-Homeodomäne von HNF1 β in bezug auf ihre Funktion während der Nephrogenese untersucht werden. HNF1 β und HNF1 α sind eng verwandte Proteine. Die Homeodomänen der beiden humanen Proteine unterscheiden sich nur in neun Aminosäuren (AS). Trotz dieses geringen Unterschiedes reichen diese neun β -typischen Aminosäuren in einem HNF1 α Protein aus, um die Wirkung von HNF1 β während der Nephrogenese bei Überexpression in *Xenopus* zu erzielen (Wu et al., 2004).

Es stellte sich hier die Frage, welche Aminosäuren dieser neun für den Einfluss von HNF1 β auf die Nephrogenese verantwortlich sind und ob sich die Wirkung auf eine Aminosäure reduzieren lässt. Hierzu wurde zunächst die Qualität des Aminosäure-Austausches betrachtet, d. h. welche Eigenschaften der Aminosäurerest von HNF1 β im Vergleich zu der entsprechenden Aminosäure in HNF1 α hat, z. B. der Wechsel einer polaren zu einer unpolaren Seitenkette, oder einer sauren zu einer basischen (Tab. 4).

Tabelle 4: Die neun Aminosäureaustausche von HNF1 α und HNF1 β in der POU-Homeodomäne.

Aminosäure-Austausch	Position	AS-austausch HNF1 α \rightarrow HNF1 β	Qualität des AS-Rests	AS in HNF1 α - Proteinen	AS in HNF1 β - Proteinen
1	G199M	Glycin zu Methionin	bleibt unpolar	G oder M	M, I oder L
2	F215Y	Phenylalanin zu Tyrosin	unpolar zu polar	F	Y
3	E219D	Glutaminsäure zu Asparaginsäure	bleibt sauer	E	D oder E
4	T231A	Threonin zu Alanin	polar zu unpolar	G, A oder T	A oder S
5	I242L	Isoleucin zu Leucin	bleibt unpolar	I oder L	I oder L
6	Q250K	Glutamin zu Lysin	polar zu basisch	Q	K
7	Q252H	Glutamin zu Histidin	polar zu basisch	A oder Q	H oder Q
8	H279Q	Histidin zu Glutamin	basisch zu polar	H	Q
9	T285A	Threonin zu Alanin	polar zu unpolar	M, V, T oder N	A

Den Aminosäureaustauschen wurden Nummern zugeordnet. Es wurden die Aminosäuren der angegebenen Positionen von den Spezies Mensch, Schwein, Ratte, Maus, Hamster, Huhn, *Xenopus*, Lachs, Kugelfisch und Zebrafisch ermittelt und in dieser Tabelle zusammengefasst.

HNF1 β und HNF1 α sind zwar hoch konservierte Proteine im Reich der Vertebraten, aber dennoch unterscheidet sich die Aminosäuresequenz an einigen Positionen bei verschiedenen Arten (Tab. 4). Besonders hoch konservierte Aminosäuren scheinen dabei für die Funktion des Proteins besonders essentiell zu sein. Diese Tatsache wurde benutzt, um die Bedeutung der Aminosäureaustausche für die Nephrogenese abzuschätzen. Dabei erschienen drei Austausche besonders wichtig (Tab. 4 fett gedruckt), weil die Eigenschaften der Aminosäurereste sich stark unterscheiden und der Austausch konsequent bei allen Spezies zu beobachten ist. Um die für die nephrogene Wirkung verantwortlichen Aminosäuren einzugrenzen, wurde ein Konstrukt in *Xenopus* überexprimiert, bei dem nur die β -typischen Austausche Nr. 8+9 enthalten waren (HNF1aaa8+9b), wie in Abb. 5A zu sehen ist. Der Austausch Nr.8 scheint elementar wichtig zu sein, denn der Austausch Histidin zu Glutamin ist bei allen getesteten Spezies zu finden. Auch beim Austausch Nr. 9 kommt die Aminosäure Alanin nur in HNF1 β vor, während bei HNF1 α an der gleichen Position die niemals Alanin, dafür aber Methionin, Valin Threonin oder Asparagin zu finden ist. Als Überprüfung, ob die nephrogene Wirkung auf die letzten beiden Aminosäureaustausche reduziert werden kann, wurde ein weiteres Konstrukt hergestellt, dass die β -typischen Aminosäuren an den Austauschpositionen 1-7 enthielt (HNF1aa1-7ba, Abb. 5A). Es wurde außerdem ein HNF1 α Konstrukt injiziert, dessen Aminosäuresequenz mit der letzten Aminosäure der Homeodomäne endete (HNF1aaaS). Dieses wurde als Kontrolle injiziert, da in vorherigen Experimenten immer ein längeres HNF1 α -Protein injiziert wurde. Dies erschien notwendig, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass dieses künstlich verkürzte HNF1 α -Protein einen Einfluss auf die Nierenentwicklung hatte. Diese Proteine sind in Abb.5A schematisch dargestellt. Sie wurden in *Xenopus* Embryonen überexprimiert, und zwar in je einem Blastomer des Zweizellstadiums. Neben der RNA für die drei HNF1-Proteine wurde außerdem GFP (green fluorescent protein) injiziert, um die injizierte Seite der Embryonen im Schwanzknospenstadium anhand der Fluoreszenz identifizieren zu können. Die freischwimmenden Larven wurden im Stadium 45 fixiert und der Pronephros durch Immunhistofärbung sichtbar gemacht. Zur Kontrolle wurden Embryonen nur mit GFP injiziert. Die Pronephri beider Seiten wurden fotografiert und die Größe gemessen und verglichen. Da alle Datenreihen normalverteilt waren, wurde mit dem t-Test berechnet, ob der Größenunterschied der Pronephri nach Injektion der HNF1-Proteine signifikant vom Größenunterschied nach GFP-Injektion verschieden war. In Abb. 5B sind die Ergebnisse der

statistischen Auswertung dargestellt, in Abb. 5C sind beispielhaft Larven mit immunhistochemisch angefärbten Pronephri zu sehen.

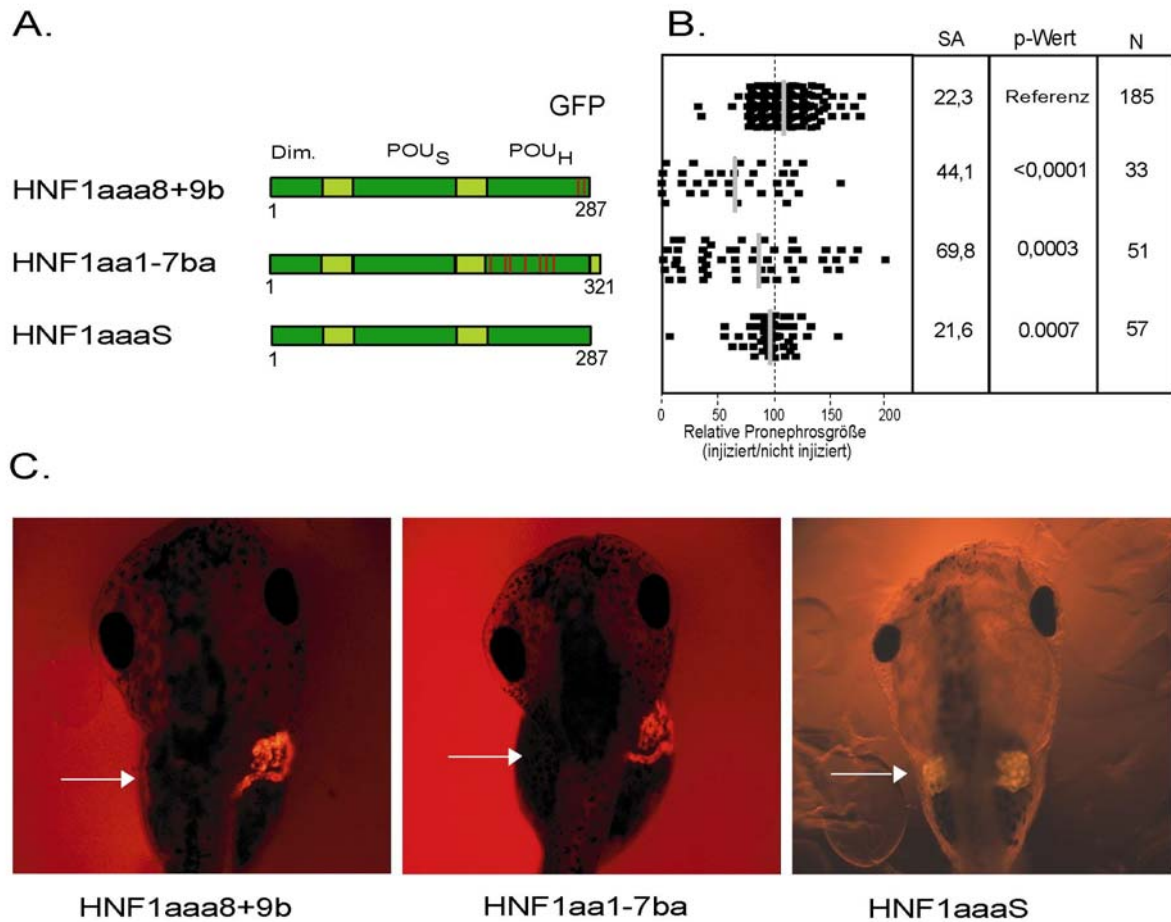


Abb. 5: Die Homeodomäne von HNF1 β läßt sich in zwei nephrogene Segmente unterteilen. A: Schematischer Aufbau der überexprimierten HNF1 α -Proteine. Oben sind die Domänen benannt. Dim. ist die Dimerisierungsdomäne, POU_S ist die POUspezifische Domäne, POU_H ist die POU Homeodomäne. Die roten Streifen innerhalb der POU-Homeodomäne markieren die HNF1 β -typischen Aminosäuren. B: Statistische Auswertung der Pronephrosgrößen nach Überexpression der links dargestellten Proteine. Die freischwimmenden Xenopus-Larven wurden in Stadium 45 fixiert. Die Pronephri wurden immunhistochemisch sichtbar gemacht und sind durch ihre rote Fluoreszenz erkennbar. Die Pronephri wurden aus lateraler Sicht fotografiert und mit METEO die Größe gemessen. Die injizierte Seite wurde mit der nicht injizierten verglichen. Bei gleich großen Pronephri auf beiden Seiten entsprach die relative Pronephrosgröße 100. Die Stichproben wurden unter Anwendung des t-Tests mit den GFP-Daten verglichen. Die Verteilung der Werte ist für jedes Protein durch schwarze Quadrate dargestellt, der graue Balken entspricht dem Mittelwert. SA ist die Standardabweichung, der p-Wert gibt die Signifikanz an, N die Anzahl der untersuchten Tiere. C: Xenopus-Embryonen mit immunhistochemisch gefärbten Pronephri nach Überexpression der oben genannten Proteine. Die injizierte Seite ist jeweils durch einen weißen Pfeil markiert.

Das Protein HNF1aaa8+9b führte zu einer signifikanten Reduktion des Pronephros auf der injizierten Seite, wie die statistische Auswertung zeigt (Abb. 5B). Die Durchschnittsgröße erreichte im Mittel 65% des Pronephros der nicht injizierten Seite. Es ist allerdings eine große Standardabweichung festzustellen. In Abb. 5C ist eine Xenopus-Larve dargestellt, bei der die

Überexpression von HNF1aaa8+9b das völlige Fehlen des Pronephros hervorgerufen hat. Zwei HNF1 β typische Aminosäuren in einem verkürzten HNF1 α -Protein waren also ausreichend, um den gleichen Phänotyp hervorzubringen, wie HNF1 β . Wie die Überexpression von HNF1aa1-7ba in *Xenopus* zeigt, ist der Einfluss der Homeodomäne von HNF1 β auf die Nephrogenese nicht auf die Aminosäureaustausche 8 und 9 beschränkt. Denn auch die HNF1 β -typischen Aminosäuren an den Austauschpositionen 1-7 der Homeodomäne bewirkten in einem HNF1 α -Protein eine signifikante Reduktion des Pronephros auf der injizierten Seite (Abb. 5B). Die Pronephri der injizierten Seite erreichten im Mittel 86% der Größe der Pronephri der nicht injizierten Seite. Auch in diesem Fall war bei einigen Tieren auf der injizierten Seite überhaupt kein Pronephros vorhanden (Abb. 5C). Bei Betrachtung der Datenverteilung fällt auch hier eine starke Standardabweichung auf. Die Überexpression des verkürzten HNF1 α -Proteins HNF1aaaS führte zu einer Pronephrosgröße von im Mittel 97% auf der injizierten Seite im Vergleich zur nicht injizierten Seite. Bei Betrachtung des Phänotyps in Abb. 5C ist kein Unterschied zwischen injizierter und nicht injizierter Seite zu erkennen. Der signifikante Unterschied zu den GFP-Kontrolltieren könnte dadurch begründet sein, dass nach Injektion von GFP allein eine leichte Pronephrosvergrößerung festgestellt wurde, und zwar im Mittel um acht Prozent. Dies ist nicht übereinstimmend mit vorher erstellten Daten, die ergaben, dass GFP keine Wirkung auf die Pronephrosentwicklung hat (Wu et al., 2004; Bohn et al., 2003). Beim Vergleich der Pronephrosgrößen nach der Überexpression von HNF1aaaS und dem entsprechend langen HNF1aaa8+9b durch den T-Test zeigt sich, dass die Überexpression von HNF1aaa8+9b zu einer hoch signifikanten Verkleinerung des Pronephros führt ($p < 0,0001$).

Während der Durchführung dieser Injektionsexperimente fiel auf, dass die Überlebensrate der Embryonen, denen die HNF1-Konstrukte HNF1aa1-7ba oder HNF1aaa8+9b injiziert wurden, gering war. Wie in Abb.6 zu sehen ist, starben die Zellen im injizierten Bereich während der Gastrulation. Dies ist an ihrer helleren Färbung und unregelmäßigen Struktur zu erkennen. Im Vergleich dazu ist ein GFP injizierter Embryo gezeigt, bei dem im fluoreszierenden Bereich keine Zellveränderungen zu erkennen sind. Da die Injektion von 250pg RNA der Proteine HNF1aa1-7ba und HNF1aaa8+9b kein Überleben der Embryonen zuließ, musste die injizierte Menge der HNF1-Konstrukte um die Hälfte reduziert werden. Die oben gezeigten Phänotypen resultieren aus der Injektion von nur 125pg RNA der Konstrukte HNF1aa1-7ba oder HNF1aaa8+9b mit 100 pg GFP-RNA. Von dem Konstrukt HNF1aaaS wurden hingegen 250 pg injiziert.

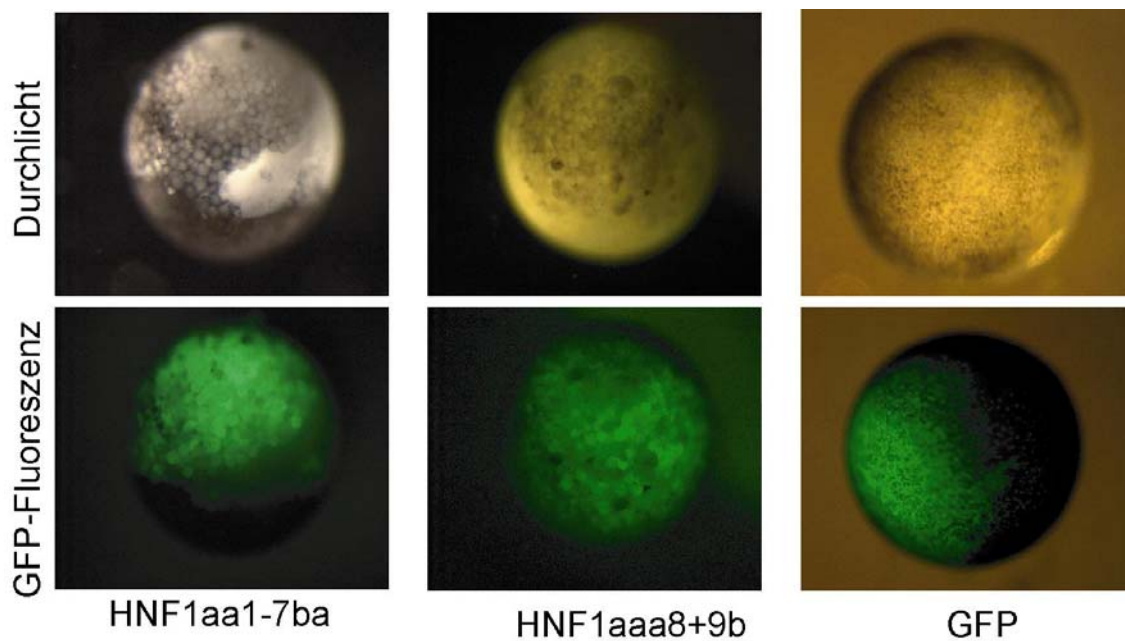


Abb. 6: Xenopus-Embryonen im Gastrula-Stadium nach der Injektion der unten angegebenen HNF1-Konstrukte mit GFP oder nur GFP. Anhand der GFP-Fluoreszenz kann der injizierte Bereich identifiziert werden. Im Durchlicht sind die Zellveränderungen der HNF1 injizierten Embryonen zu beurteilen.

Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass sowohl die ersten sieben β -typischen Aminosäureaustausche der Homeodomäne eine Wirkung auf die Nephrogenese haben, als auch die achte und neunte, denn die Überexpression beider Konstrukte führte zu einer Reduktion bis hin zum völligen Fehlen des Pronephros. Diese Wirkung kann demnach nicht auf eine einzige Aminosäure reduziert werden. Außerdem führte die Überexpression von HNF1aa1-7ba und HNF1aaa8+9b zu Defekten in der Embryonalentwicklung.

3.2 Suche nach nierenspezifischen Interaktionspartnern von HNF1 β

Um Interaktionspartner von HNF1 β zu identifizieren, die während der Nierenentwicklung eine Rolle spielen, wurde ein bakterielles Two-Hybrid-System benutzt, nämlich das BacteriomatchII-Two Hybrid System von Stratagene. In diesem System gibt es zwei Hybridproteine, die gemeinsam in der Lage sind, die Transkription von Reportergenen zu aktivieren, wenn zwischen ihnen eine Protein-Protein-Interaktion stattfindet. Das Köderprotein, für welches Interaktionspartner gesucht werden sollte, wurde durch Klonierung in den pBT-Vektor mit dem DNA-bindenden Lamda-Repressor fusioniert. Als Köderprotein wurde ein verkürztes HNF1 β Protein benutzt, welches die drei Segmente mit Wirkung auf die Nephrogenese enthält (AS 1-352, HNF1bbb) (Wu et al., 2004) sowie ein verkürztes HNF1 α Protein von entsprechender Länge (AS 1-321, HNF1aaa), welches keinen Einfluss auf die Nephrogenese in *Xenopus* hat. Damit sollten in einem zweiten Schritt Informationen über die Spezifität der Interaktion gewonnen werden. Die potentiellen Interaktionspartner, die in einer humanen foetalen cDNA-Bank gesucht wurden, waren mit der RNA-Polymerase α -Untereinheit zu Hybridproteinen fusioniert. Dazu wurden sie in den pTRG-Vektor kloniert (Abb. 7).

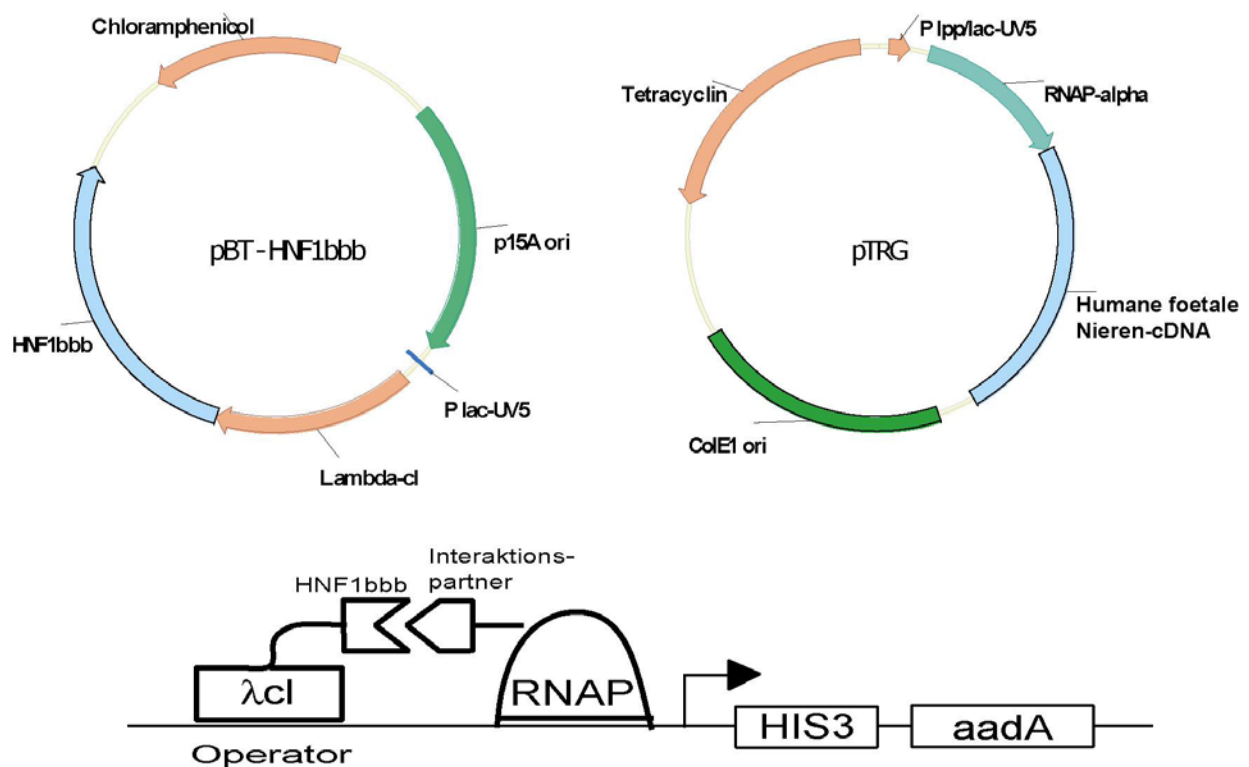


Abb. 7: Funktionsweise des Bacteriomatch-Two-Hybrid-Systems mit HNF1bbb als Köderprotein und einer humanen foetalen cDNA-Bank als Zielquelle. Links oben ist der Bait-Vektor pBT dargestellt, in den HNF1bbb so hineingebracht wurde, dass es sich im Leserahmen an den λ -Repressor (λ -cl) anschließt, sodass ein Fusionsprotein entsteht. Rechts oben ist das Target-Plasmid pTRG zu sehen, in den die humane foetale Nieren-cDNA-Bank hineingebracht wurde, sodass Fusionsproteine aus der RNA-Poymerase- α -Untereinheit (RNAP-alpha) mit Proteinen aus der cDNA-Bank entstehen. Die Expression dieser Fusionsproteine werden durch die IPTG induzierbaren Promotoren P lac-UV5 und Plpp/lac-UV5 reguliert. P15A ori und ColE1 ori sind Replikationsursprünge, die eine sehr geringe Kopienzahl der Plasmide verursachen. Unten ist die Reporter-Kassette dargestellt, die sich im F-Epison des *E. coli* Reporterstammes befindet. λ cl ist der Lambdarepressor, RNAP ist die RNA-Polymerase, HIS3 kodiert ein Enzym, das zur Synthese von Histidin benötigt wird. aadA kodiert Streptomycinresistenz.

Die cDNA-Bank wurde aus Nierengewebe von fuenf männlichen Foeten im Alter von 17-28 Wochen hergestellt und war von Stratagene bereits in den pTRG Vektor kloniert worden. Die Selektion derjenigen Klone, in denen eine Interaktion zwischen dem Köderprotein HNF1bbb und einem Zielprotein der Niere stattfindet, beruht auf der Aktivierung von Reportergenen (Abb. 7 unten): Der λ -Repressor bindet an den Lambda-Operator in der DNA der Reporter-Kassette, die sich auf dem F-Epison von *E. coli* befindet. Das mit dem λ -Repressor fusionierte HNF1bbb interagiert mit einem Protein der cDNA-Bank, das seinerseits mit der alpha-Untereinheit der RNA-Polymerase fusioniert ist. Dadurch bindet die RNA-Polymerase aufgrund der Interaktion an den Promotor und startet die Transkription der Reportergene HIS3, welches das Wachstum auf Histidin-Mangelmedium erlaubt, sowie aadA, das Streptomycinresistenz verleiht.

3.2.1 Expression der Fusionsproteine λ -cl-HNF1aaa und λ -cl-HNF1bbb in *E. coli*

XL1 Blue

Um zu sehen, ob die Fusionsproteine λ -cl-HNF1bbb und λ -cl-HNF1aaa in *E. coli* in voller Länge exprimiert wurden, wurde ein Western Blot mit einem anti- λ -Antikörper durchgeführt. Zum Vergleich wurden noch zwei weitere Proteine getestet. Zum einen das Fusionsprotein λ -cl-Gal4, das durch das Plasmid pBT-LGF2 kodiert wird. Es ist ein Hybridprotein, das aus dem λ -cl und der Dimerisierungsdomäne (40AS) des Transkriptionsaktivators Gal4 besteht. Zum anderen wurde λ -cl ohne Fusionsprotein getestet. Um unspezifische Bindungen des Erstantikörpers zu erkennen, wurde außerdem das Lysat von untransformiertem *E. coli* eingesetzt.

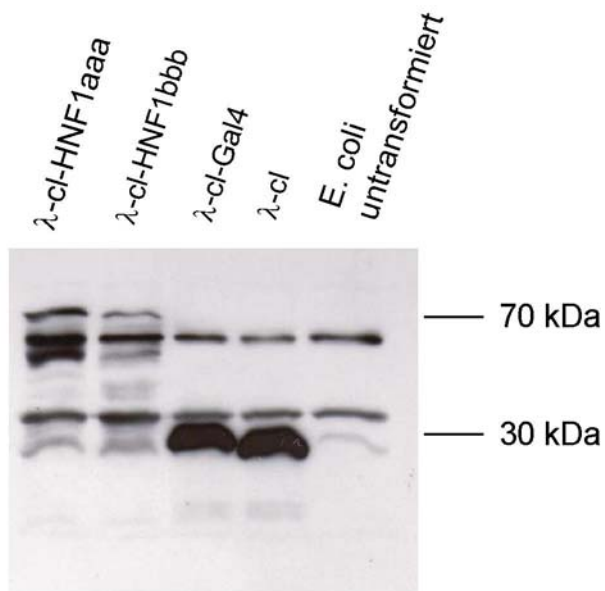


Abb. 8: Nachweis der Fusionsproteine λ -cl-HNF1aaa und λ -cl-HNF1bbb: *E. coli* Bakterien wurden mit pBT-HNF1aaa, pBT-HNF1bbb, pBT-LGF2 oder pBT transformiert und Flüssigkulturen hergestellt. Die Expression der Fusionsproteine wurde mit IPTG induziert. 20 μ l jeder Kultur wurden mit Lämmli-puffer aufgekocht und im Western-Blot mit dem anti- λ -Antikörper auf Fusionsproteine untersucht.

Wie in Abb. 8 zu sehen ist, haben die HNF1- λ -Fusionsproteine die erwartete Größe von etwa 70 kDa. Außerdem sind kürzere Nebenbanden zu sehen. λ -cl-Gal4 entspricht erwartungsgemäß etwa 31 kDa, da die fusionierte Gal4-Domäne nur 40 AS enthält. Die pBT transformierten *E. coli* erzeugten nur das λ -cl-Protein, das erwartungsgemäß etwa einer Größe von 27 kDa entspricht.

3.2.2 Die Köderproteine λ -HNF1bbb und λ -HNF1aaa können die Reportergene nicht selbst aktivieren

Die Expression der Reportergene HIS3 und aadA kann nicht nur durch Interaktion der Hybridproteine aktiviert werden, sondern kann auch durch Selbstaktivierung durch das Köderprotein gestartet werden. Man spricht von Selbstaktivierung, wenn HNF1aaa oder HNF1bbb, die mit λ -cl fusioniert sind, ohne Zielprotein direkt mit der RNA-Polymerase α -Untereinheit interagieren könnten, sodass die Polymerase an den Promotor binden und die Transkription der Reportergene starten könnte, ohne dass es einem fusionierten Zielprotein bedürfe. Daher wurde das Selbstaktivierungspotential von HNF1aaa und HNF1bbb getestet, bevor die Suche nach Interaktionspartnern beginnen konnte. Dazu wurden die HNF1aaa bzw. HNF1bbb enthaltenden pBT Plasmide mit dem Bankplasmid pTRG ohne Zielprotein in den E. coli Reporterstamm cotransformiert. Das Wachstum auf nichtselektivem Medium zeigte, wie gut die Cotransformation funktioniert hat, während das selektive Medium Wachstum nur für solche Klone möglich war, bei denen das Reportergen HIS3 aktiviert wurde, denn es enthält kein Histidin und den kompetitiven Inhibitor des HIS3 Enzyms 3-Aminotriazol (3-AT). Dieses ist notwendig, denn das Reportergen HIS3 wird auch dann in einem geringen Maße transkribiert, wenn es nicht durch Interaktion aktiviert ist. Die Menge an 3-AT ist besonders kritisch, da zuviel dieses HIS3-Inhibitors auch dann die Histidin-Synthese verhindern würde, wenn das Reportergen HIS3 aktiviert ist. Bei zu wenig 3-AT wäre der Selektionsdruck auf Interaktion zu gering. Das dualselektive Medium enthielt außerdem Streptomycin.

Tabelle 5: HNF1aaa und HNF1bbb sind nicht in der Lage, die Transkription der Reportergene zu aktivieren.

Transformierte Plasmide	Anzahl der Kolonien auf nichtselektivem Medium	Anzahl der Kolonien auf selektivem Medium (HIS3)	Anzahl der Kolonien auf dualselektivem Medium (HIS3 + Strep ^r)
pBT-HNF1aaa + pTRG	11700	0	0
PBT-HNF1bbb + pTRG	5500	0	0
Positivkontrolle: pBT-LGF2 + pTRG-Gal1p	100000	10000	700
Negativkontrolle: pBT + pTRG-Gal1p	100000	4	0

Auf nichtselektivem Medium wurde eine 1:100 Verdünnung des Transformationsansatzes ausplattiert und die Anzahl der Kolonien anschließend hochgerechnet. In Klammern sind die für das Wachstum zu aktivierenden Reportergene für entsprechende Medien angegeben.

Wie der Tab. 5 zu entnehmen ist, war weder HNF1aaa noch HNF1bbb in der Lage, die Transkription der Reportergene zu aktivieren, da weder auf selektivem Medium (HIS3), noch auf dualselektivem (HIS3 + Strep^f) Klone wachsen konnten. Beide waren also als Köderprotein geeignet. Um zu testen, ob die Zusammensetzung der Medien korrekt war, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurden als Positivkontrolle die Plasmide pBT-LGF2 und pTRG-Gal11p cotransformiert. pBT-LGF2 kodiert das Fusionsprotein λ -cl-Gal4 und pTRG-Gal11p ein Fusionsprotein aus der α -Untereinheit der RNA-Polymerase und 90 AS des Proteins Gal11p. Es ist bekannt, dass Gal4 und Gal11p eine robuste Interaktion in *E. coli* zeigen. Somit wurde hier erwartet, dass durch die Interaktion dieser Fusionsproteine die Reportergene aktiviert werden konnten. Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, ermöglichte die Aktivierung der Reportergene in diesem Experiment das Wachstum von Kolonien auf selektivem und dualselektivem Medium d. h. dass die Reportergene durch die Interaktion wie erwartet aktiviert wurden. Zum anderen wurde als Negativkontrolle der pBT-Vektor ohne Insert mit pTRG-Gal11p cotransformiert. Hier wurde keine Interaktion und somit keine Aktivierung der Reportergene erwartet, da der Interaktionspartner Gal4 fehlte. Auf selektivem Medium wurde das Wachstum von nur 4 Kolonien beobachtet, während auf nichtselektivem Medium 100000 Kolonien wachsen konnten. Da weniger als 0,1% auf selektivem Medium wuchsen, zeigte sich, dass die Selektion durch den kompetitiven Inhibitor des HIS3-Enzyms funktionierte. Da auch keine Kolonien auf dualselektivem Medium zu finden waren, bewies dies die Fehlerfreiheit des Systems.

Anhand der Anzahl der Kolonien auf den nichtselektiven Platten fällt auf, dass aus der Cotransfektion von HNF1aaa oder HNF1bbb mit pTRG um etwa den Faktor 10 weniger Kolonien wuchsen als bei den Kontrollen. Dies ist entweder auf eine schlechtere Transformationseffizienz zurückzuführen, oder die Expression der HNF1-Fusionsproteine wirkte sich ungünstig auf das Wachstum von *E.coli* aus.

3.2.3 Bacteriomatch-Two-Hybrid Suche von HNF1bbb-Interaktionspartnern

Zunächst wurde die gekaufte cDNA-Bank amplifiziert, indem 1,8 Mio. Klone auf Tetracyclin-haltigem LB-Medium ausplattiert und nach einer Wachstumszeit von 24h von den Platten abgeschabt wurden. Aus den gewonnenen Bakterien wurde die DNA isoliert. Zur

Cotransformation wurden je 200 ng von pBT-HNF1bbb und 200 ng der cDNA-Bank in den E.coli XL1Blue Reporterstamm cotransformiert. Die Anzahl der erzielten Cotransformanten wurde ermittelt, indem ein verdünntes Aliquot auf nichtselektiven Platten ausgestrichen, und aus der Anzahl der Einzelkolonien die Anzahl der Cotransformanten berechnet wurde. Aus diesem Experiment wurde ermittelt, dass 1,24 Millionen Cotransformanten entstanden waren, von denen aber nur 495 auf selektivem Medium auf wachsen konnten. Nach Überimpfung auf dualselektives Medium wuchsen noch 335 Klone. Um die Interaktion für jeden potentiellen Interaktionspartner zu bestätigen, wurde das pTRG-Plasmid der cDNA Bank aus jedem Klon isoliert. Dazu war es notwendig, die Klone zunächst in tetracyclinhaltigem Vollmedium anzuziehen, damit das pTRG-Plasmid weitergegeben werden musste, während das pBT-Plasmid nicht mehr gebraucht wurde, da der Selektionsdruck durch Chloramphenicol entfiel. Aus allen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert. Diese wurde erneut in E.coli XL1Blue transformiert. Die transfizierten Bakterien wurden auf tetrazyclinhaltigem LB-Agar ausplattiert. Von jedem Ansatz wurden 5-10 Klone durch überimpfen auf tetrazyclinhaltiges und chloramphenicolhaltiges LB-Agar auf Anwesenheit beider Plasmide überprüft. Von solchen Klonen, die nur das pTRG-Plasmid trugen, wurde die DNA isoliert und weiter verwendet. Um die Interaktion zu bestätigen, wurde jedes einzelne der 335 pTRG-Plasmide mit pBT-HNF1bbb in den Reporterstamm cotransformiert. Auf nichtselektivem Medium wurde die Transformationseffizienz getestet, auf selektivem Medium wurde die Transkription des Reportergens HIS3 getestet. Außerdem wurden die pTRG-Plasmide mit dem pBT Vektor ohne Insert in den Reporterstamm cotransformiert, um das Selbstaktivierungspotential des durch die cDNA der Bank kodierten Peptides zu überprüfen. Bei 94 Klonen wurde die Interaktion bestätigt und es wurde keine Selbstaktivierung festgestellt. Weitere 94 zeigten die Interaktion nicht mehr und wurden verworfen. 147 Klone beinhalteten pTRG-Plasmide, deren Fusionsproteine die Reportergene selbst aktivieren konnten. Auch diese wurden nicht weiter analysiert.

Die Interaktion der Kandidaten wurde auch mit HNF1aaa getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Anzahl der Klone auf den selektiven Platten verschieden sein konnten (Abb. 9). Hier sind exemplarisch die auf selektivem Medium getesteten Cotransformanten des Bankplasmids mit pBT-HNF1aaa, pBT-HNF1bbb und pBT ohne Insert zur Überprüfung des Selbstaktivierungspotentials dargestellt. Das Peptid des Bankplasmids 45/5 konnte mit HNF1aaa anscheinend nur schwach die Transkription des Reportergens HIS3 aktivieren, denn es sind nur wenige Klone zu sehen. Mit HNF1bbb interagierte es viel stärker, denn es sind viele Kolonien sichtbar. Bei dem Peptid des Plasmids 2/8 verhielt es sich umgekehrt. Durch

die Cotransformation dieser pTRG-Plasmide mit dem pBT-Vektor konnte kein Wachstum von Kolonien beobachtet werden. Das heißt, dass die kodierten Peptide nicht die Fähigkeit besaßen, selbst die Transkription der Reportergene zu aktivieren. Bei den meisten getesteten Klonen waren deutliche Unterschiede der Interaktionsstärke zu sehen. Jedoch fand sich unter allen 335 getesteten potentiellen Interaktionspartnern kein einziger, der entweder nur mit HNF1aaa oder HNF1bbb interagierte. Eine geringe Anzahl von Kolonien war immer bei der Cotransformation mit dem schwächer interagierenden HNF1-Protein zu sehen.

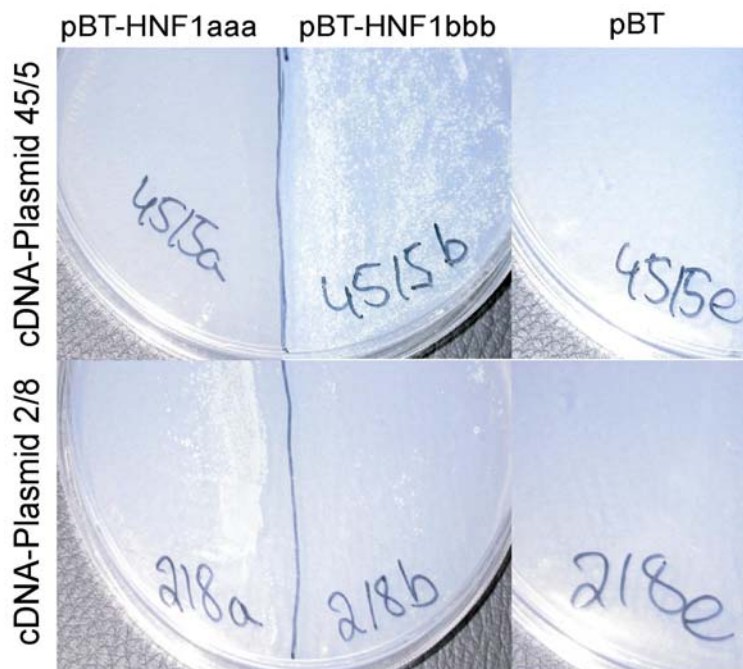


Abb. 9: Exemplarische Darstellung von Cotransformationsklonen auf selektivem Medium: E. coli Reporterstamm cotransformiert mit cDNA-Plasmiden 45/5 oder 2/8 und pBT-HNF1aaa oder pBT-HNF1bbb zur Überprüfung der Interaktion sowie dem pBT-Vektor ohne Fängerprotein zur Überprüfung des Selbstaktivierungspotentials. Das Wachstum der Klone war auf diesem Medium nur möglich, wenn die Transkription des Reportergens HIS3 durch Interaktion oder Selbstaktivierung aktiviert wurde.

3.2.4 Identität der sequenzierten Interaktionspartner

Von den 94 Klonen, bei denen die Interaktion bestätigt und eine Selbstaktivierung ausgeschlossen wurde, wurde das cDNA-Insert sequenziert, um das interagierende Protein zu identifizieren. Nur sieben enthielten einen offenen Leserahmen mit mehr als 20 Aminosäuren, der ein bekanntes Protein kodierte. Die übrigen können in drei Kategorien eingeteilt werden: Die erste Gruppe enthielt Leserahmen, die durch die zufällige Fusion an den Leserahmen der α -Untereinheit der RNA-Polymerase nicht dem bekannten Leserahmen entsprachen, sondern verschoben war. Bei der zweiten waren sehr kurze fusionierte Peptidsequenzen mit weniger als 20 Aminosäuren zu finden, die dem C-Terminus eines Proteins entsprachen. Als dritte

Gruppe waren noch solche Peptidsequenzen zu finden, die durch eine cDNA kodiert wurde, die aus dem 3'-untranslatierten Ende einer mRNA stammten. Das spiegelt wieder, dass es sich bei der benutzten cDNA-Bank um eine Bank handelt, zu deren Herstellung oligo-dt-Primer benutzt wurden. Daher begann die reverse Transkription stets am Poly-A-Ende einer mRNA. Da die durchschnittliche cDNA-Länge 1,39kb entsprach, wurden daher häufig nur das 3'-untranslatierte Ende der mRNA oder ein noch kurzes sich anschließendes Stück des offenen Leserahmens transkribiert. Neben diesen drei Gruppen wurden außerdem einige mitochondrial kodierte Proteine gefunden. Diese wurden nicht näher analysiert, weil sich der genetische Code von Mitochondrien von dem des menschlichen Zellkerns unterscheidet.

Die sieben bekannten offenen Leserahmen sind in Tabelle 6 dargestellt. Es handelt sich hierbei um einen Leserahmen ohne bekanntes Protein, C17orf 45, sowie sechs bekannte Proteinen. PCBD1, auch Dimerization Cofactor of HNF1 β (DCoH) genannt, ist ein bekannter Interaktionspartner von HNF1 β (Hansen et al., 1993). Er hat keinen Einfluss auf die Nierenentwicklung (Pogge von Strandmann 2000) und wurde daher nicht weiter untersucht, kann aber als Positivkontrolle für das Two-Hybrid-System gewertet werden. Von den übrigen fünf Proteinen DAK, E4F1, HADH, TRIM26 und ZFP36L1 wurden verschieden lange Peptidsequenzen des C-Terminus gefunden, wie in der Tabelle 6 gezeigt ist. Dabei zeigte sich, dass manche Interaktionspartner stärker mit HNF1aaa oder HNF1bbb interagierten, ZFP36L1 interagierte als einziger gleich stark mit beiden HNF1-Proteinen. Die Funktionen der Interaktionspartner sind kurz beschrieben. Abgesehen von TRIM26 sind sie hoch konserviert, denn man findet sie im Reich der Vertebraten oder sogar im Reich der Eukaryoten als konserviert vor. Betrachtet man die chromosomale Lokalisation, so fällt auf, dass E4F1 in der Nähe des PKD1 Gens lokalisiert ist. Mutationen dieses Gens verursachen polyzystische Nieren.

Tabelle 6: Interaktionspartner von HNF1bbb, gefunden in einer humanen foetalen Nieren-cDNA-Bank mittels BacteriomatchII-Two-Hybrid-System.

Gensymbol	Fusionierte Aminosäuren	Interaktion mit		Funktion	Konservierung	Chromosomale Lokalisation
		HNF1aaa	HNF1bbb			
C17orf45*	108-131	n. b.	n. b.	unbekannt	unbekannt	17p11
PCBD1*	1-104	n. b.	n. b.	Dimerisierungskofaktor von HNF1 α und HNF1 β	Eukaryoten	10q22
DAK	483-575	+	++	Dihydroxyacetonkinase	Eukaryoten	11q12
E4F1*	289-785	n. b.	n. b.	Phosphoprotein, am Zellzyklus beteiligt	Vertebraten	16p3
HADH	28-381	+	++	Beta Oxidation von Fettsäuren in Mitochondrien, bei Mutation erblicher Hyperinsulinismus	Eukaryoten	4q22
TRIM26, Isoform CRA_C*	74-109	++	+	RING-Fingerprotein, vermutlich mit DNA-Bindungsfunktion, Rolle in Ubiquitinylierung	Mammalia	6p21
ZFP36L1	284-338	+	+	führt zum mRNA-Abbau durch Bindung an das 3' untranslatierte Ende	Vertebraten	14q22

Mit * markierte Peptidsequenzen wurden von Nima Mottalebi in einem zweiten Screen gefunden. ** TRIM 26 wurde in beiden voneinander unabhängigen Screens identifiziert, es handelte sich um einen Klon mit exakt der gleich langen cDNA-Sequenz. + bedeutet schwache Interaktion, ++ bedeutet starke Interaktion. n.b. bedeutet „nicht bekannt“.

Bei DAK war die vorhergesagte Phosphatasedomäne im gefundenen C-terminalen Bereich enthalten. Das Zinkfinger-Protein E4F1 enthält zehn Zinkfinger des C2H2-Typs, von denen sechs im gefundenen C-terminalen Abschnitt lokalisiert sind. HADH ist eine 3-hydroxyacyl Dehydrogenase. Sie enthält eine NAD bindende Domäne. Sie wurde fast vollständig im Two-Hybrid-System gefunden, es fehlten 27 AS des N-Terminus. TRIM26 enthält im N-terminalen Bereich eine Ring-Domäne, die darauf hinweist, dass es sich um ein DNA-bindendes Protein handelt, die Funktion der hier gefundenen C-terminalen Domäne dieser kurzen Splice-Variante ist jedoch nicht bekannt. Das Zinkfingerprotein 36L1 enthält zwei Zinkfinger des Typs C3H-1. Diese sind jedoch nicht im C-terminalen Teil enthalten, das im Two-Hybrid-System gefunden wurde. Letzterer beinhaltet eine Funktion, die zur Rekrutierung RNA-abbauender Enzyme führt, die genaue Funktion ist jedoch nicht bekannt. Es kann also daraus geschlossen werden, dass durch das bakterielle Two-Hybrid-System Domänen unterschiedlicher Tertiärstruktur und Funktion als HNF1bbb Interaktionspartner identifiziert wurden und die Interaktion nicht auf dem gleichen Motiv beruhte.

3.2.5 Bestätigung von vier Interaktionspartnern in vitro mittels GST-Pull-down Analysen

Mittels GST pull down wurde überprüft, ob sich auch in vitro eine Interaktion von HNF1bbb oder HNF1aaa mit den Interaktionspartnern beobachten ließ. Dazu wurden die humanen Proteine in voller Länge benutzt, da die Deletion einzelner Proteinbereiche zu einer anderen Oberfläche der Proteine führen kann, aufgrund dessen es zu Proteininteraktionen kommen kann, die unter natürlichen Umständen nicht auftreten könnten. Für C17orf45 war der entsprechende Klon nicht zu erwerben, daher wurde dieser Interaktionspartner nicht untersucht. Zur Untersuchung der übrigen wurden zunächst die Fusionsproteine GST-HNF1aaa und GST-HNF1bbb in *E. coli* hergestellt. In Abbildung 10 ist ein Coomassie gefärbtes denaturierendes Acrylamid-Gel mit den Fusionsproteinen, sowie dem GST ohne fusioniertes Protein zu sehen.

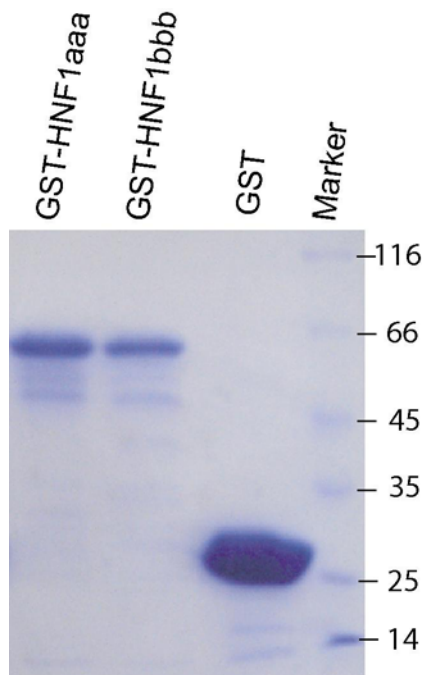


Abb. 10: GST-HNF1-Fusionsproteine Die Proteine wurden in *E. coli* überexprimiert und an Glutathione-Sepharose-Beads gebunden. Nach mehrfachen Waschschritten wurden die Beads in Laemmli-Probenpuffer gekocht und in einem denaturierenden SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Die Banden des Markers entsprechen der links in kDa angegebenen Größe.

Die Hauptbanden zeigen die GST-Proteine in den erwarteten Größen. Neben den starken Hauptbanden sind noch sehr viel schwächere, kleinere Banden zu sehen. Der Grund hierfür könnte sein, dass die kodierenden Triplets nicht *E. coli* spezifisch, sondern humanspezifisch waren, was in *E. coli* gelegentlich zum Abbruch der Proteinsynthese führen kann. Des Weiteren ist ein deutlicher Mengenunterschied an gebundenem Protein zwischen den Fusionsproteinen und GST allein zu beobachten. Zur Durchführung der GST-Pulldown Analysen wurden jedoch äquimolare Mengen der HNF1-GST-Fusionsproteine sowie GST eingesetzt. Die mit einem myc-tag auf der N-terminalen Seite versehenen Interaktionspartner humanen Ursprungs wurden in voller Länge mit dem Retikulozytenlysatsystem TNT von Promega hergestellt und per Western Blot auf vollständige Expression überprüft (nicht gezeigt). Nach Durchführung der GST-Pull-down Analysen wurden die Überstände der aufgekochten Glutathion-Sepharose-Beads im Western Blot mit einem anti-myc Antikörper getestet, um die Interaktionspartner zu detektieren. Die Nitrocellulosemembranen wurden anschließend mit Ponceau-S gefärbt um zu zeigen, dass die GST-Proteine in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt worden waren (nicht gezeigt).

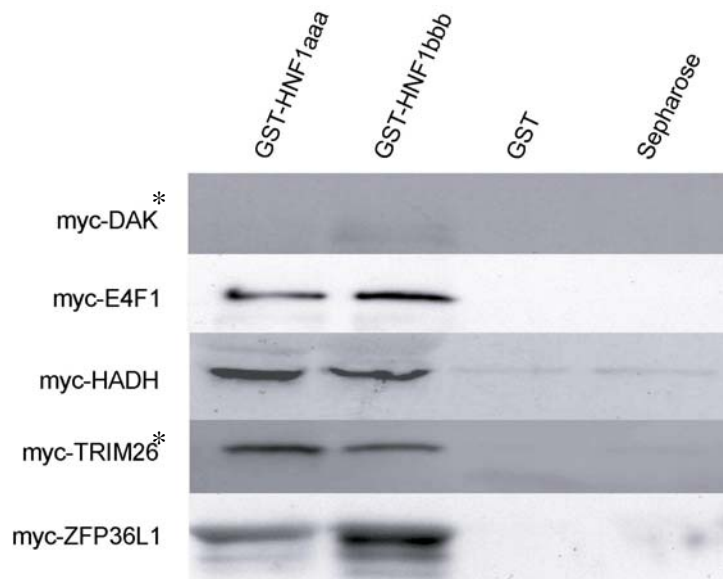


Abb. 11: Vier Interaktionspartner interagieren in vitro mit HNF1bbb und HNF1aaa in GST-Pulldown Analysen: An Glutathione-Sepharosebeads gekoppelte Fusionsproteine GST-HNF1aaa, GST-HNF1bbb und GST sowie Glutathione-Sepharose ohne GST wurden mit den myc-getaggen Interaktionspartnern (siehe links) 1h bei RT inkubiert. Nach fünf Waschschritten wurden die Beads in Laemmli-Probenpuffer aufgekocht und im Western Blot mit dem Maus-anti-myc-Antikörper 9E10 auf die Präsenz der Interaktionspartner getestet. Bei mit * markierte Interaktionspartner zeigten bei 100 mM Natriumchlorid (NaCl) keine Interaktion. Daher wurde der NaCl-Gehalt auf 50mM reduziert.

Der potentielle Interaktionspartner DAK interagiert bei einer Natrium-Chlorid-Konzentration (NaCl) von 100 mM im Inkubationspuffer weder mit GST-HNF1aaa noch mit GST-HNF1bbb. Die Reduktion der NaCl-Konzentration auf 50 mM bewirkte keine Änderung, wie der Western Blot (Abb. 11 oben) zeigt. DAK wurde aus diesem Grund nicht weiter auf die Rolle in der Nephrogenese untersucht. Bei den vier Interaktionspartnern E4F1, HADH, TRIM26 und ZFP36L1 waren die Proteine nach Durchführung der GST-Pull-down Analysen mit GST-HNF1aaa oder GST-HNF1bbb klar detektierbar. Außerdem wurden die Proteine mit GST beladenen Sepharosebeads inkubiert, um auszuschließen, dass die Interaktionspartner mit GST interagieren. Des weiteren wurde überprüft, ob die Interaktionspartner direkt an die mit BSA gesättigten Glutathion-Sepharose-Beads binden können. Wie aus den Western Blots in Abb. 11 hervorgeht, interagierten die Interaktionspartner weder mit GST, noch mit den Beads. Die Interaktion von E4F1, HADH, TRIM26 oder ZFP36L1 in vitro mit HNF1aaa oder HNF1bbb war folglich spezifisch. Bei TRIM26 war die Interaktion erst nachzuweisen, nachdem der NaCl-Gehalt des Inkubationspuffers NETN von 100 auf 50mM reduziert worden war. Das bedeutet, dass diese Interaktion schwach ist.

3.2.6 Wirkung der Interaktionspartner auf die Nephrogenese in *Xenopus laevis*

Um beurteilen zu können, ob die gefundenen Interaktionspartner tatsächlich während der Nierenentwicklung relevant sind, wurden sie in *Xenopus* Embryonen überexprimiert, und zwar durch RNA-Injektion in ein Blastomer des Zweizellstadiums. Um die biologische Relevanz einzuschätzen, wurden zwei Kriterien herangezogen: Zum einen die signifikante

Veränderung der Pronephrosgröße auf der injizierten Seite im Vergleich zur GFP-Kontrollgruppe, zum anderen sichtbare morphologische Veränderungen des Pronephros auf der injizierten Seite.

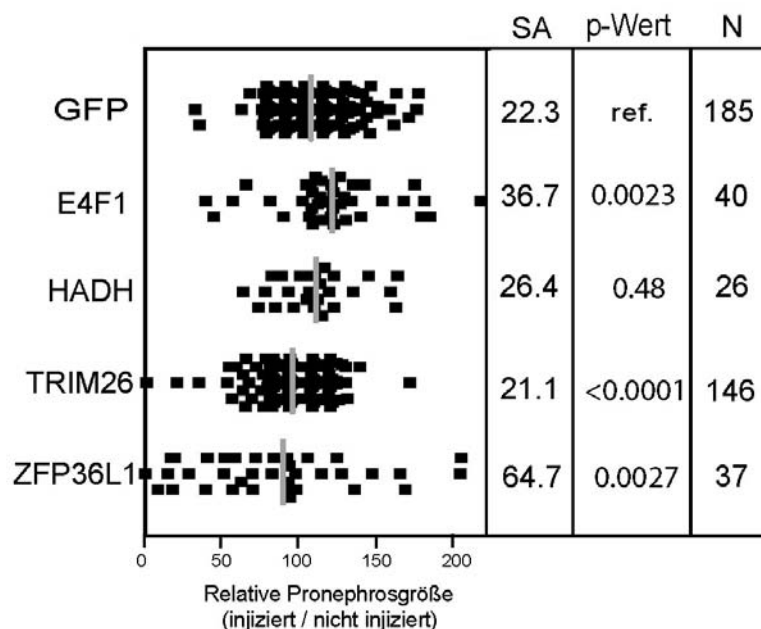


Abb. 12: Beeinflussung der Pronephrosgröße durch Überexpression der Interaktionspartner. Die freischwimmenden *Xenopus*-Larven wurden in Stadium 45 fixiert. Die Pronephri wurden immunhistochemisch sichtbar gemacht. Die Pronephri wurden aus lateraler Sicht fotografiert und mit METEO die Größe gemessen. Die injizierte Seite wurde mit der nicht injizierten verglichen. Bei gleich großen Pronephri auf beiden Seiten entsprach die relative Pronephrosgröße 100. Alle Stichproben waren normalverteilt und wurden mit dem t-Test mit den GFP-Daten verglichen. Die Verteilung der Werte ist für jedes Protein durch schwarze Quadrate dargestellt, der graue Balken entspricht dem Mittelwert. SA ist die Standardabweichung, der p-Wert gibt die Signifikanz an, N die Anzahl der untersuchten Tiere.

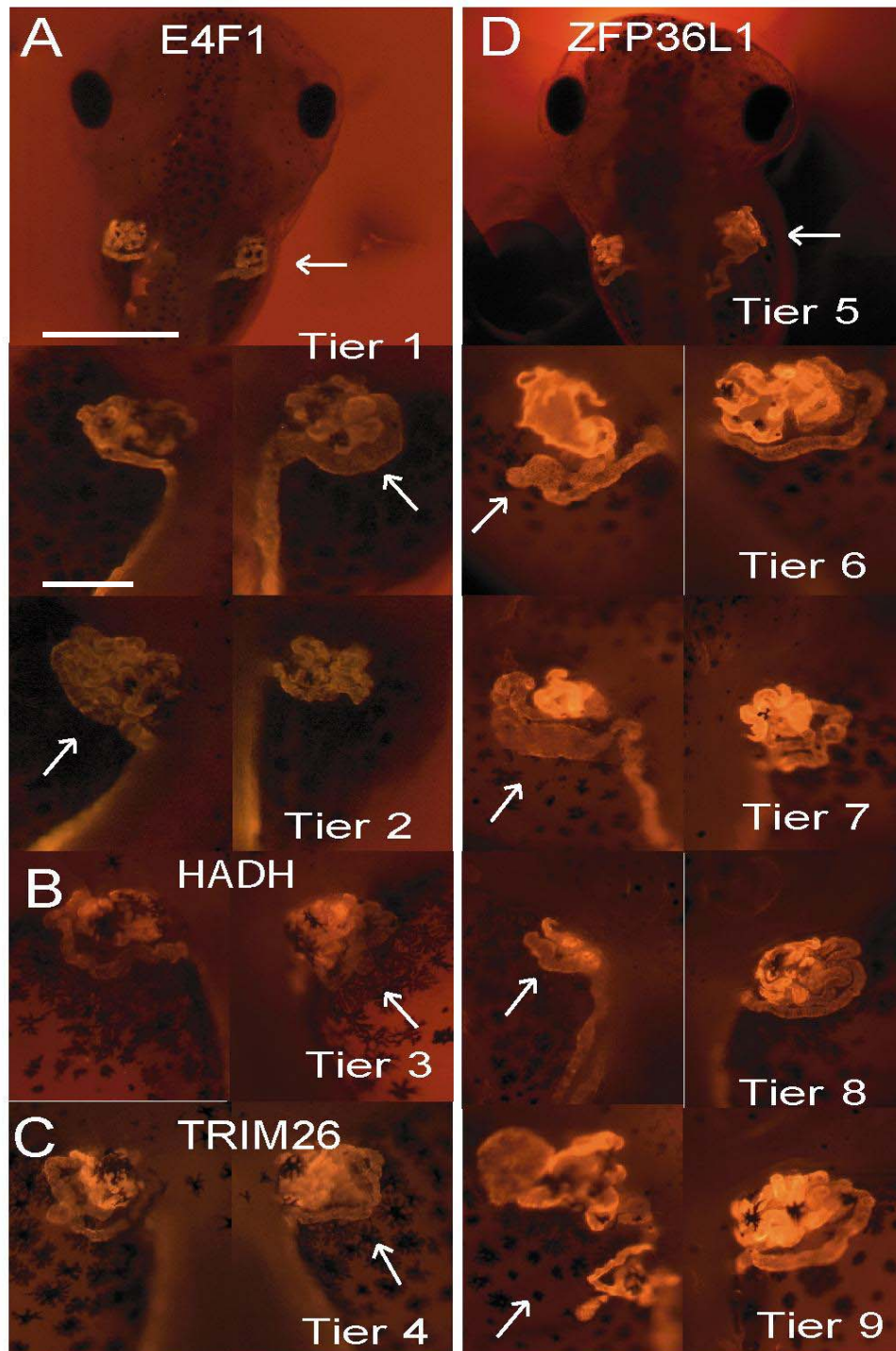


Abb. 13: Einfluss der überexprimierten Interaktionspartner auf die Morphologie des Pronephros. Die Pronephri der fixierten Larven in Stadium 45 wurden mit den Erstantikörpern 3G8 (Tubuli) und 4A6 (Ductus) und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. A: Die Überexpression von E4F1 führte zu einer Vergrößerung des Pronephros : Oben: E4F1 injizierte Larven von dorsal. Der Balken entspricht 1mm. Mitte + unten: Pronephri von Tier 1 + Tier 2 aus lateraler Sicht. Der Balken entspricht 200µm. B: Die Überexpression von HADH führte zu keiner morphologischen Veränderung. Pronephri einer HADH überexprimierten Larve aus lateraler Sicht. C: Die Überexpression von TRIM26 führte zu keiner morphologischen Veränderung. Pronephri einer TRIM26 injizierten Larve aus lateraler Sicht. D: Die Überexpression von ZFP36L1 bewirkte verschiedene morphologische Veränderungen des Pronephros. Oben ZFP36L1 injizierter Embryo aus dorsaler Sicht, darunter: Pronephri ZFP36L1 injizierter Larven aus lateraler Sicht. Die injizierte Seite wird stets durch einen weißen Pfeil markiert.

Die Überexpression von E4F1 resultierte in einer signifikanten Vergrößerung des Pronephros (Abb. 12) im Vergleich zu den GFP-Kontrolltieren (Mittelwert 121). Diese Vergrößerung kam durch zweierlei Effekte zustande (Abb. 13A). Wie in Tier 1 zu sehen ist, kam es einerseits zu einer Verdickung von Tubuli und Ductus, außerdem aber, wie mit Tier 2 dokumentiert, zu einer Verlängerung der Tubuli und des Ductus.

Die Überexpression von HADH zeigte weder eine signifikante Vergrößerung des Pronephros im Vergleich zu den GFP-Kontrolltieren (Abb. 12), noch war eine Morphologieveränderung infolge der HADH-Überexpression zu beobachten (Abb. 13B).

Die Überexpression von TRIM 26 führte zu einer signifikanten Verkleinerung des Pronephros im Vergleich zu den GFP-Kontrolltieren (Abb. 12). Allerdings betrug der Unterschied der Pronephri in einem Tier der injizierten und nicht injizierten Seite im Mittel nur 3,5%, und morphologisch sind keine Veränderungen aufgrund der Überexpression von TRIM 26 feststellbar (Abb. 13C). In dieser Versuchsreihe wurde eine leichte Vergrößerung des Pronephros durch GFP-Injektion um 8% im Mittel beobachtet. In früheren Versuchsreihen wurde kein Einfluss auf die Pronephrosgröße durch GFP festgestellt (Bohn et al., 2003; Wu et al., 2004).

Da die Überexpression von HADH und TRIM26 keine klare Wirkung auf die Morphologie des Pronephros in *Xenopus* zeigte, konnte es möglich sein, dass diese Proteine in *Xenopus* nicht exprimiert wurden. Um dies auszuschließen, wurde ein Western Blot der Proteinextrakte einiger Larven durchgeführt, wobei HADH (50 kDa) und TRIM26 (oberhalb der 25 kDa Markierung) anhand des fusionierten myc-tags detektiert wurden (Abb. 14).

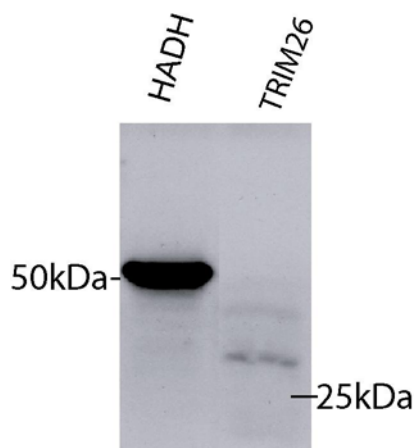


Abb. 14: Nachweis der überexprimierten Proteine HADH und TRIM26 aus Lysaten von *Xenopus*embryonen. Die Proteine wurden mit Hilfe des monoklonalen Anti-myc-Antikörpers 9E10 im Western Blot detektiert.

Wie im Westen Blot zu sehen ist, wurde sowohl HADH als auch TRIM26 in *Xenopus* exprimiert. Allerdings ist ein deutlicher Mengenunterschied feststellbar.

Trotz bewiesener Expression von HADH und TRIM26 in *Xenopus* Embryonen waren bei HADH weder Veränderungen in der Größe noch in der Morphologie zu erkennen, bei TRIM26 wurde ein minimaler Effekt auf die Größe und kein Effekt auf die Morphologie des Pronephros festgestellt. Daher wurden diese beiden Proteine nicht weiter untersucht.

Die Überexpression von ZFP36L1 in *Xenopus* führte im Mittel zu einer signifikanten Verkleinerung des Pronephros auf der injizierten Seite (MW=90), die allerdings mit einer hohen Streuung verbunden war (Abb. 12). Betrachtet man die Morphologie der Pronephri auf der injizierten Seite (Abb. 13D), wird der Grund für diese Streuung offensichtlich: Die Phänotypen variierten sehr stark: Bei Tier 5 und Tier 7 ist eine Verdickung des Ductus zu erkennen. Tier 6 weist eine Zyste in den Tubuli auf, bei Tier 8 ist Reduktion der Pronephrosgröße zu sehen und bei Tier 9 sind zusätzliche Tubuli am posterior befindlichen Teil des Ductus zu erkennen. Abgesehen von der Reduktion des Pronephros haben die anderen Phänotypen eher eine Vergrößerung des Pronephros zufolge. ZFP36L1 störte offensichtlich die Entwicklung des Pronephros auf mehreren Ebenen.

Neben dem Einfluss auf die Nierenentwicklung war die Überexpression von E4F1 und ZFP36L1 letal, wenn 250pg RNA injiziert wurde. Daher musste die injizierte RNA-Menge auf 125pg pro Embryo reduziert werden, damit die Embryonen sich entwickelten und bis zum Stadium 45 überlebten um zu den hier präsentierten Auswertungen herangezogen werden konnten.

Zusammenfassend gingen aus diesem Versuchsteil E4F1 und ZFP36L1 als biologisch relevante Proteine für die Pronephrosentwicklung hervor und wurden weiter analysiert.

3.2.7 Whole mount in situ Hybridisierung von E4F1 und ZFP36L1

Um zu überprüfen, ob die Expression der Interaktionspartner E4F1 und ZFP36L1 während der Entwicklung mit der HNF1 β Expression in der sich entwickelnden Pronephrosanlage überlappt, wurde eine in situ Hybridisierung dieser drei Faktoren durchgeführt und die Expressionsmuster verglichen. Dazu wurde die *Xenopus*-spezifische RNA benötigt, damit eine Hybridisierung der Sonden an die Transkripte erfolgen konnte. Die *xenopus*spezifische HNF1 β cDNA stand zur Verfügung (Vignali et al., 2000). Für E4F1 gibt es keine *Xenopus laevis* cDNA. Daher wurde die *Xenopus tropicalis* cDNA zur Herstellung der Sonden verwendet. Diese ist aufgrund der engen Verwandtschaft von *X.laevis* und *X. tropicalis* auch

in *X. laevis* zur Herstellung der Sonden geeignet. Zur Herstellung der ZFP36L1 Sonden wurde die entsprechende homologe cDNA namens C3H-2 verwendet. Es wird aber weiterhin die Bezeichnung ZFP36L1 benutzt.

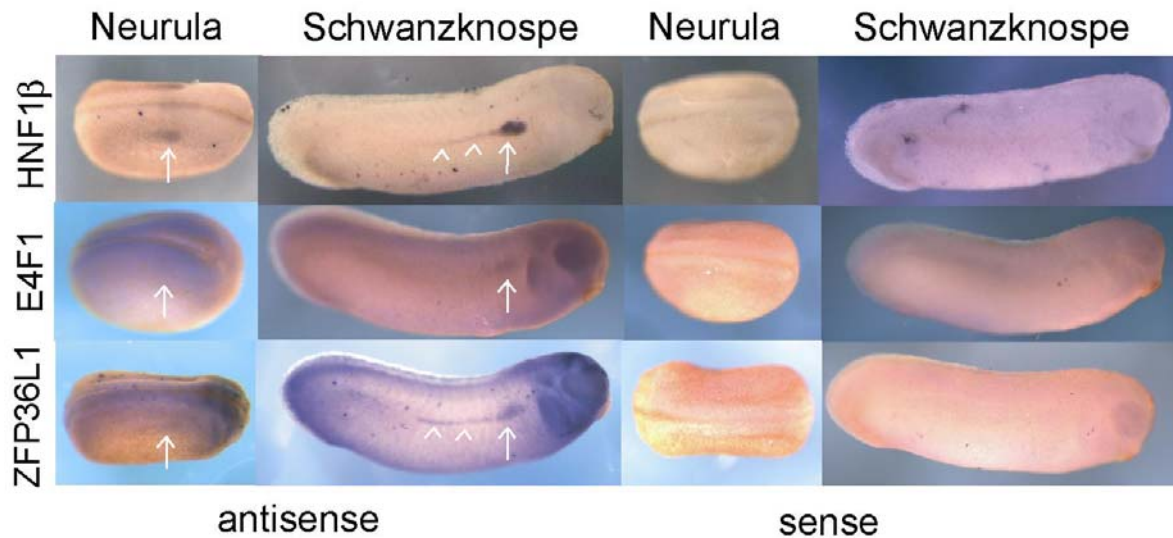


Abb. 15: Whole mount in situ Hybridisierung im Neurula –bzw. Schwanzknospenstadium mit Sonden gegen HNF1 β , E4F1 und ZFP36L1. Die weißen Pfeile markieren die Expression der getesteten Faktoren in der Pronephrosanlage im Neurulastadium und die Vorläuferzellen der Tubuli im Schwanzknospenstadium. Die weißen Pfeilspitzen markieren die Pronephrosregionen, aus denen der Ductus hervorgeht. Die sense-RNA wurde jeweils als Negativkontrolle benutzt. Die in situ Hybridisierungen gegen HNF1 β wurden aus der Bachelorarbeit von S. Rosengarten entnommen.

In Abb. 15 ist oben links die Whole mount in situ Hybridisierung von HNF1 β zu sehen. Im Neurulastadium ist eine Expression in der Pronephrosanlage zu erkennen, die durch einen weißen Pfeil markiert ist. Dieses Signal ist spezifisch, denn die Hybridisierung mit dem sense-Strang bringt kein Signal hervor. Im Schwanzknospenstadium ist die Expression von HNF1 β sowohl in den sich entwickelnden Tubuli (weißer Pfeil), als auch im sich ausdifferenzierenden Ductus (weiße Pfeilspitzen) zu sehen. Die Spezifität dieser Expression wird durch das Fehlen des Signals mit der Sense-Probe im Schwanzknospenstadium deutlich (oben rechts). Im Gegensatz zu HNF1 β wird E4F1 ubiquitär exprimiert, was an der gesamten bläulichen Färbung zu erkennen ist, die im Vergleich zu den genau gleich behandelten Embryonen mit den Senseproben deutlich wird. Während der Neurulation hebt sich keine stärkere Expression von E4F1 in der Pronephrosanlage ab, wohl aber während des Schwanzknospenstadiums. Die sich entwickelnden Tubuli zeigen ein verstärktes Signal (weißer Pfeil). In den Vorläuferzellen des Ductus ist jedoch keine verstärkte Expression sichtbar. Die Expression von ZFP36L1 ist während der Neurulation diffus im Bereich der Pronephrosanlage zu sehen (weißer Pfeil), im Schwanzknospenstadium ist die Expression klar im sich entwickelnden Pronephros sichtbar,

nämlich sowohl in den Vorläuferzellen der Tubuli (weißer Pfeil) als auch im Ductus (weiße Pfeilspitzen). Die mit der sense-RNA hybridisierten Tiere weisen keine Signale auf und beweisen hiermit die Spezifität der antisense-RNA Signale.

3.2.8 Zelluläre Lokalisation von HNF1 β und den Interaktionspartnern E4F1 oder ZFP36L1

In HEK 293 Zellen, die ihren Ursprung in humanen embryonalen Nierenzellen haben, wurde überprüft, ob sich HNF1 β und die Interaktionspartner im selben Zellkompartiment befinden. Dazu wurde das GFP fusionierte HNF1 β und die humanen, mit dem myc-tag versehenen Interaktionspartner in HEK293 Zellen transfiziert und die Interaktionspartner immunhistochemisch sichtbar gemacht. Mittels confocaler Mikroskopie wurden die Zellen auf Colokalisation der beiden Interaktionspartner überprüft (Abb. 16). E4F1 ist ein nukleäres Protein (Paul et al., 2006). HNF1 β ist ebenfalls im Kern lokalisiert (Boulikas et al., 1994; Wu et al 2004). In HEK293 Zellen, in denen einzeln HNF1 β oder E4F1 exprimiert wurde, wurde dies bestätigt (nicht gezeigt). In den hier gezeigten Experimenten wurden je 0,9 μ g Rc/CMV-GFP-HNF1 β und pCS2+mt-E4F1 transfiziert. Wie die Abb. 16 zeigt, colokalisieren beide im Kern in punktartigen Strukturen.

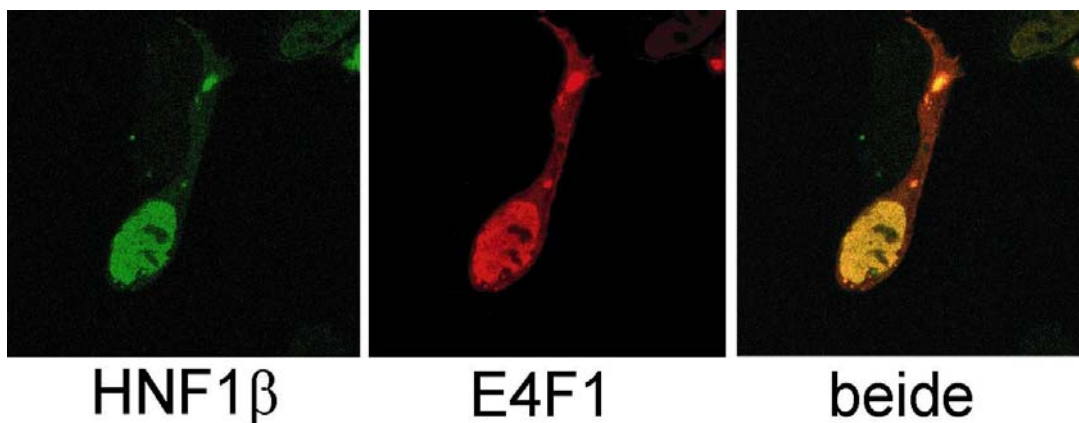


Abb. 16: E4F1 und HNF1 β colokalisieren im Zellkern von HEK293 Zellen. Die transfizierten Zellen wurden mittels confokaler Mikroskopie untersucht. Dazu wurde HNF1 β mit einem GFP-tag benutzt. Dies ist daher durch die grüne Fluoreszenz sichtbar. E4F1 war am N-terminus mit einem myc-tag versehen und durch einen Cy3-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Die rote Fluoreszenz gibt seine Lokalisation wieder. Bei Colokalisation ist eine gelbe Fluoreszenz zu sehen.

ZFP36L1 ist, wie in Phillips et al beschrieben, überwiegend zytoplasmatisch. In den hier gezeigten Zellen wurde HNF1 β und ZFP36L1 im Verhältnis 3:1 und 1:3 transfiziert, um zu sehen, ob sich durch den Überschuss des einen Proteins die Lokalisation des anderen ändert. In beiden Versuchsansätzen war HNF1 β jedoch immer im Zellkern lokalisiert und ZFP36L1 im Zytoplasma (Abb. 17). HNF1 β und ZFP36L1 beeinflussten ihre Lokalisation gegenseitig folglich nicht. Gelegentlich wurde eine Überlappung an der Kernmembran beobachtet.

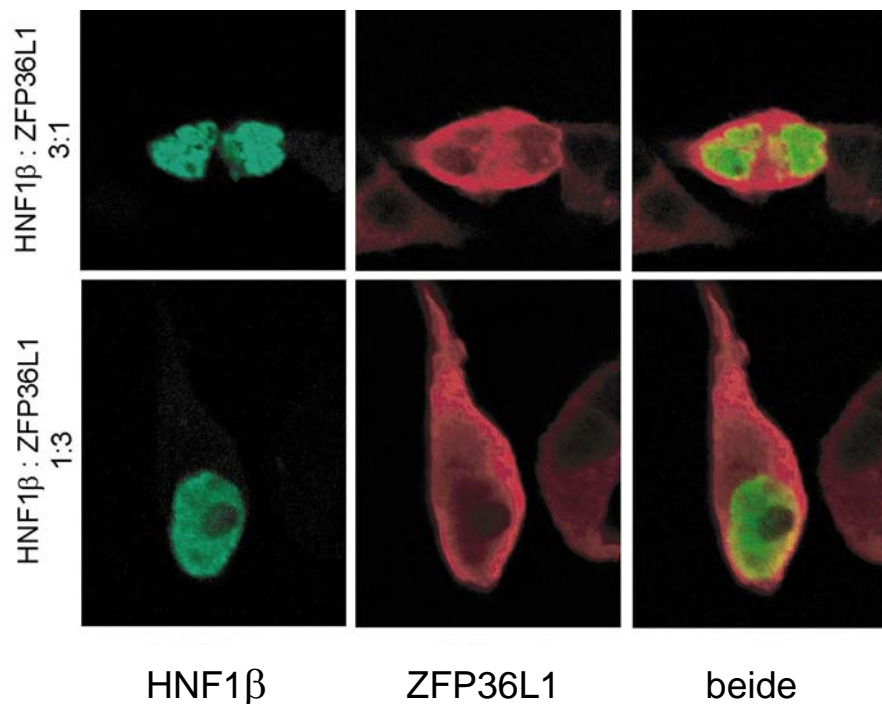


Abb. 17: HNF1 β befindet sich im Zellkern, ZFP36L1 im Zytoplasma von HEK293 Zellen. Links ist das DNA-Mengenverhältnis angegeben. Die transfizierten Zellen wurden mittels confokaler Mikroskopie untersucht. Dazu wurde HNF1 β mit einem GFP-tag benutzt. Dies ist daher durch die grüne Fluoreszenz sichtbar. E4F1 war am N-terminus mit einem myc-tag versehen und durch einen Cy3-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Die rote Fluoreszenz gibt seine Lokalisation wieder. Bei Colokalisation ist eine gelbe Fluoreszenz zu sehen.

3.2.9 Beeinflussung des HNF1 β -Transaktivierungspotentials durch die Interaktionspartner E4F1 und ZFP36L1

Im folgenden Teil sollte getestet werden, ob die Interaktionspartner E4F1 und ZFP36L1 in der Lage sind, das Transaktivierungspotential von HNF1 β basierend auf der vermuteten Protein-Protein-Interaktion zu beeinflussen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden Promotor-Luciferase-Konstrukte transient in HEK293 Zellen transfiziert und nach 24h die Luciferaseaktivität gemessen. Dazu wurden zunächst der Osteopontinpromoter (OPN) und der Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) Promotor benutzt, dessen Transaktivierung durch HNF1 β bereits gezeigt wurde (Senkel et al., 2005). Die Aktivität der Luciferase galt als Maß für die Transaktivierung.

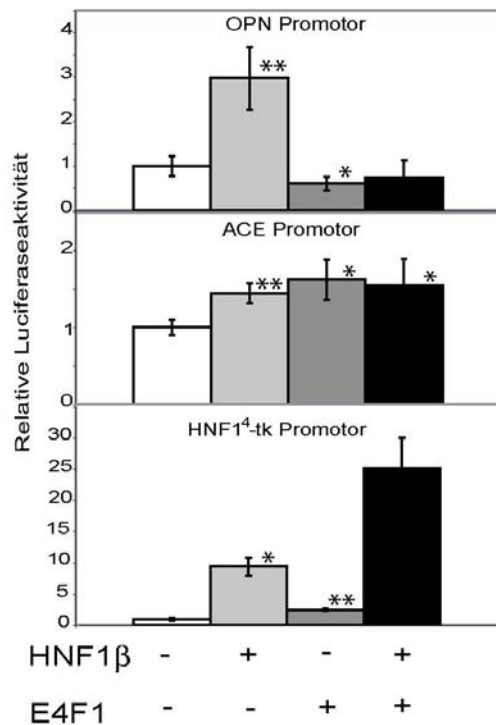


Abb. 18: Die Beeinflussung des Transaktivierungspotentials von HNF1 β durch E4F1 beruht nicht nachweislich auf einer Protein-Protein-Interaktion. 3×10^5 Zellen pro six well Schale wurden mit 0,2 μ g Reporterkonstrukt, 0,4 μ g Rc/CMV-HNF1 β und 1,2 μ g pCS2+mt-E4F1 transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Luciferaseaktivität des Promotor-Luciferase-Konstrukts wurde auf eins normiert. Signifikanter Unterschied zur Aktivität der Luciferase-Promotorkonstrukte: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

In Abb. 18 sind die Luciferaseexperimente mit dem Interaktionspartner E4F1 dargestellt. Die Aktivität des OPN-Promotors wurde durch Cotransfektion mit HNF1 β um das dreifache erhöht (Abb. 18 oben). Transfizierte man den OPN-Promotor allein mit E4F1, so wurde die Aktivität um die Hälfte verringert. Transfizierte man den OPN-Promotor, HNF1 β und E4F1, so war keine Transaktivierung durch HNF1 β mehr zu sehen. Da E4F1 jedoch die Aktivität des OPN-Promotors allein reduzierte, ist unklar, ob dieser starke Effekt auf eine Protein-Protein-Interaktion zurückzuführen ist. Bei Tests mit dem ACE2-Promotor wurde durch die Cotransfektion von E4F1 keine Veränderung des Transaktivierungspotentials von HNF1 β festgestellt (Abb. 18 Mittlerer Teil). Da aus diesen Experimenten keine klare Aussage getroffen werden konnte, wurde ein künstlich hergestellter Promotor, nämlich der Tymidinkinase-Promotor mit vier HNF1-Bindestellen für das Experiment verwendet. Das Transaktivierungspotential dieses Promotors wurde sowohl von HNF1 β als auch von E4F1 erhöht (Abb. 18 unten). Bei einer Transfektion beider Faktoren gleichzeitig mit dem Promotorkonstrukt ergab sich eine noch höhere Transaktivierung, die etwa dem Produkt der Transaktivierungserhöhung beider einzeln transfizierter Faktoren entsprach. Eine Verstärkung der Transaktivierungsaktivität, die aus der Interaktion der Proteine beruht, konnte demnach nicht eindeutig gezeigt werden.

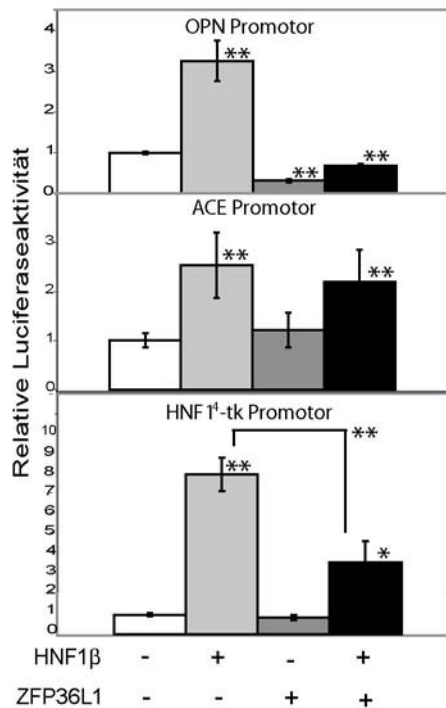


Abb. 19: ZFP36L1 beeinflusst das Transaktivierungspotential von HNF1 β . 3×10^5 Zellen pro six well Schale wurden mit 1,8 μ g Gesamt-DNA transfiziert. Es wurden jeweils 0,1 μ g Reporterkonstrukt eingesetzt. Mit dem OPN-Promotor wurden HNF1 β und ZFP36L1 im Verhältnis 1:2, mit dem ACE2-Promotor im Verhältnis 1:7,5 und mit dem HNF1⁴-tk-Promotor im Verhältnis 1:1 transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Luciferaseaktivität des Promotor-Luciferase-Konstrukts wurde auf eins normiert. Signifikanter Unterschied zur Aktivität der Luciferase-Promotorkonstrukte * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

In Abb. 19 sind die Experimente mit ZFP36L1 dargestellt. Unter Verwendung des OPN-Promotors zeigte sich, dass ZFP36L1 allein in der Lage war, die Aktivität des Promotorkonstrukts auf etwa ein Drittel zu reduzieren (Abb. 19 oben). Daher konnte aus dem Ergebnis, das durch die Transfektion von HNF1 β und ZFP36L1 erlangt wurde, ebenfalls keine eindeutige Information gewonnen werden. Der ACE2-Promotor wurde durch ZFP36L1 weder aktiviert noch gehemmt und das Transaktivierungspotential von HNF1 β blieb unbeeinflusst (Abb. 19 Mitte). Unter Verwendung des HNF1⁴-tk-Promotors (Abb. 19 unten) zeigte ZFP36L1 keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotorkonstrukts. Bei Cotransfektion des Promotorkonstrukts, HNF1 β und ZFP36L1 zeigte sich eine Reduzierung des Transaktivierungspotentials von HNF1 β um etwa die Hälfte. Diese Reduktion ist sehr signifikant, wie der t-Test zeigt. Sie ist wahrscheinlich auf die Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen, da ZFP36L1 alleine keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors hatte.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle der Homeodomäne von HNF1 β während der Nephrogenese

Die Homeodomäne von HNF1 β spielt eine wichtige Rolle während der Nephrogenese. Sie gehört zu den drei Elementen von HNF1 β , die die Nephrogenese beeinflussen (Wu et al., 2004). Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass die Homeodomäne des Transkriptionsfaktors HNF1 β fusioniert mit dem N-terminalen Teil von HNF1 α (AS 1-196), der die Dimerisierungsdomäne und die POU spezifischen Domäne enthielt, bei Überexpression in *Xenopus*-Embryonen eine Reduktion der Pronephrosgröße hervorrief (HNF1aabH), wie es auch bei der Überexpression von HNF1 β oder der verkürzten Mutante HNF1bbb der Fall war. Die Überexpression des entsprechend verkürzten HNF1aaa beeinflusste die Pronephrosentwicklung hingegen nicht (Wu et al., 2004). Die Homeodomäne von HNF1 β unterscheidet sich in nur neun Aminosäuren von der Homeodomäne des eng verwandten Transkriptionsfaktors HNF1 α . In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob noch weniger als neun β -typische Aminosäuren in einem HNF1 α -Protein eine Wirkung auf die Nephrogenese vermitteln können, und ob diese Funktion auf eine Aminosäure reduziert werden kann. Um den Aufbau der injizierten HNF1-Proteine leichter nachvollziehen zu können, sind alle hier diskutierten Proteine und ihre Wirkung in Abb. 20 dargestellt.

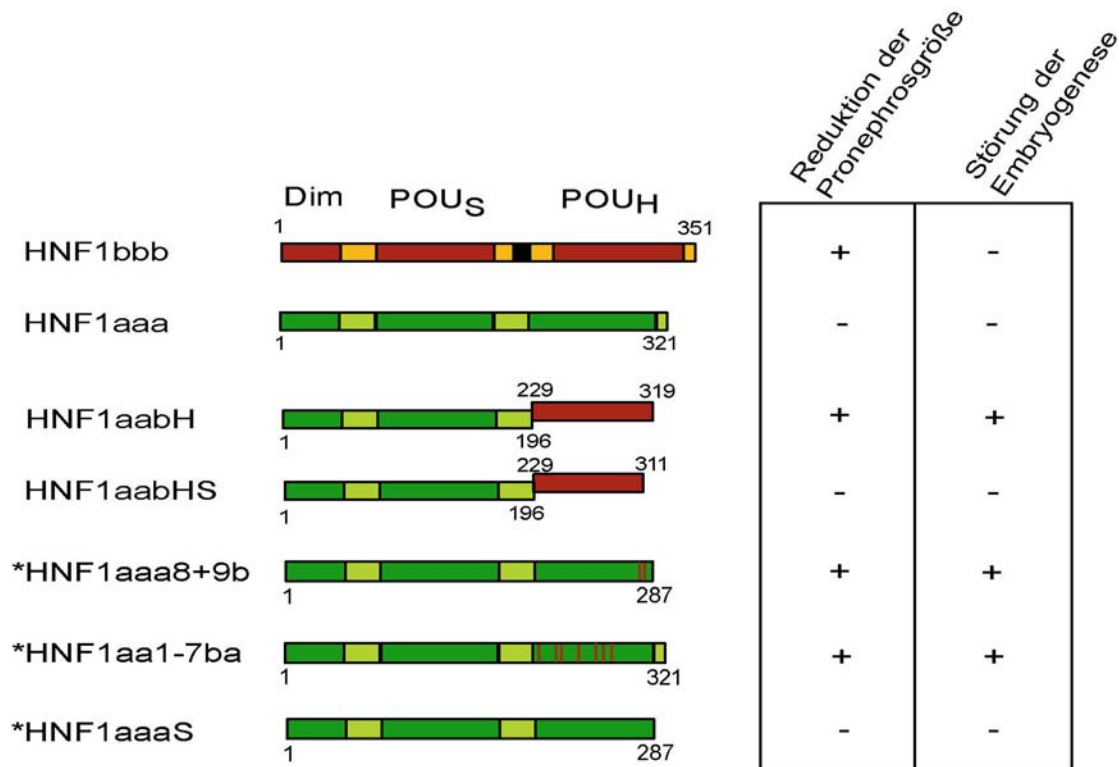


Abb. 20: Versuchsergebnisse zur Funktion der Homeodomäne von HNF1 β während der Pronephrosentwicklung in *Xenopus*. Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse stammen aus dieser Arbeit, die übrigen aus Wu et al. HNF1 β ist in rot und orange dargestellt, HNF1 α in hell- und dunkelgrün. Die 26 zusätzlichen AS zwischen der POU_S-spezifischen und der POU Homeodomäne in HNF1bbb sind durch eine schwarze Box dargestellt. Da sich die Homeodomänen von HNF1 α und HNF1 β nur in neun Aminosäuren unterscheiden, wurden bei den Konstrukten HNF1aaa8+9b und HNF1aa1-7ba die β -typischen Aminosäuren durch rote Striche markiert. Dim ist die Dimerisierungsdomäne, POU_S die POU-spezifische Domäne und POU_H die Homeodomäne.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein HNF1 α -Protein, das nur an zwei Positionen in der Homeodomäne die Aminosäuren von HNF1 β trägt, nämlich die Austausch 8 und 9 (HNF1aaa8+9b) bei Überexpression in *Xenopus laevis* zu einer Reduktion der Pronephrosgröße führte (Abb. 5). Das zeigt, dass der Austausch dieser Aminosäuren zu einer Funktionsänderung des Proteins führt. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass ein HNF1 α -Protein, bei dem von den neun verschiedenen Aminosäuren der Homeodomänen von HNF1 α und HNF1 β die ersten sieben HNF1 β -typisch sind und die achte und neunte HNF1 α -typisch (HNF1aa1-7ba), die Überexpression in *Xenopus* ebenfalls eine Reduktion der Pronephrosgröße auf der injizierten Seite zur Folge hatte (Abb. 5). Einerseits reichten also die ersten sieben HNF1 β -typischen Aminosäuren der Homeodomäne in einem HNF1 α -Rückgrad aus, andererseits aber auch die achte und neunte, um die Pronephrosentwicklung zu beeinflussen. Diese Funktion kann daher nicht einer einzigen HNF1 β -typischen Aminosäure zugesprochen werden. Möglicherweise addieren sich ihre

Effekte, wenn alle Aminosäuren der Homeodomäne HNF1 β typisch sind. Dieses Konstrukt (HNF1aabH) wurde von Wu et al in *Xenopus* überexprimiert und hatte eine starke Reduktion der Pronephrosgröße zur Folge. Es wurde gezeigt, dass eine Deletion der letzten acht Aminosäuren des Konstrukts HNF1aabH dazu führt, dass dieses chimäre Protein (HNF1aabHS) keine Wirkung mehr auf die Nephrogenese hat (Wu et al., 2004). Durch die hier beobachteten Effekte durch die Überexpression der Proteine HNF1aaa8+9b und HNF1aa1-7ba kann geschlossen werden, dass die Deletion dieser letzten acht Aminosäuren zu einem Funktionsverlust führt (Abb. 20). Die Funktion ist wieder hergestellt, wenn diese Aminosäuren angefügt werden und unabhängig davon, ob die Aminosäuren an den Positionen 311 und 317 (Aminosäureaustausch 8 und 9) α -typisch oder β -typisch sind.

Die Überexpression der Proteine HNF1aaa8+9b und HNF1aa1-7ba resultierte in einer Verkleinerung des Pronephros. Allerdings zeigen diese Daten eine große Streuung (Abb. 5B). Der Grund dafür ist zum einen, dass die Menge der injizierten RNA nicht bei jedem Embryo genau gleich war, da sie optisch durch die Tropfengröße und die Öffnung der Nadel bestimmt wurde. Zum anderen verteilte sich die RNA nicht in jedem Embryo gleich gut. Das liegt daran, dass die Zeit bis zur nächsten Zellteilung nicht immer gleich lang war und nicht immer die gleiche Region des Blastomers im Zweizellstadium getroffen wurde. Es wurden jedoch nur solche Embryonen zur Auswertung herangezogen, die im Bereich der Pronephrosanlage eine grüne Fluoreszenz aufwiesen. Da die GFP-mRNA mit der HNF1aaa8+9b oder HNF1aa1-7ba mRNA coinjiziert wurde, war durch die sichtbare GFP-Fluoreszenz sichergestellt, dass diese Proteine auch im Bereich der Pronephrosanlage überexprimiert wurden.

Es wurde außerdem gezeigt, dass chimäre HNF1-Proteine, die eine Homeodomäne von HNF1 β enthielten, bei der aber die 26 Aminosäuren, die nur in Splicevariante A von HNF1 β vorhanden sind, fehlten, bei Überexpression in *Xenopus* zur Letalität der Embryonen führten (z. B. HNF1aabH, Wu et al 2004, Abb. 20). Auch in den Versuchen dieser Arbeit, bei denen nur zwei bzw. sieben der neun verschiedenen Aminosäuren der Homeodomäne den β -Aminosäuren entsprachen, konnte diese Letalität festgestellt werden (HNF1aaa8+9b und HNF1aa1-7ba) (Abb. 6). Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Embryonen nicht mehr starben, wenn die letzten acht Aminosäuren der Homeodomäne deletiert waren (HNF1aaHS, Wu et al 2004, Abb. 20).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die Letalität als auch die Reduktion der Pronephrosgröße beobachtet wurde, wenn das gleiche Konstrukt mit zusätzlich den letzten 8 AS von HNF1 α (HNF1aa1-7ba) überexprimiert wurde (Abb. 5). Das bedeutet, dass diese acht Aminosäuren zwar einerseits wichtig sind, damit das Protein überhaupt eine Wirkung auf

die Nephrogenese hat, aber sie müssen nicht den Aminosäuren von HNF1 β entsprechen, sondern es ist ausreichend, wenn es die Aminosäuren von HNF1 α sind. Der Grund für die Letalität der Embryonen mit diesen Konstrukten beruht vermutlich darauf, dass HNF1 β neben seiner Rolle in der Nephrogenese auch noch andere Funktionen in der frühen Embryonalentwicklung hat. In *Xenopus* ist HNF1 β für die Induktion des Mesoderms essentiell (Vignali et al., 2000). *Xenopus* HNF1 β wurde mit der Repressordomäne engrailed (EngR) fusioniert und in *Xenopus* Embryonen überexprimiert. Dorsale Injektion der XHNF1 β /EngR mRNA verhinderte die dorsale Mesodermbildung, ventrale Injektion verhinderte die ventrale Mesodermbildung. HNF1 β spielt eine Rolle bei der Nachhirnentwicklung. Diese embryonalen Entwicklungsschritte könnten durch Überexpression der chimären HNF1-Proteine gestört sein.

Außerdem könnte die Überexpression nicht natürlich vorkommender Proteine, wie hier die HNF1 α -Proteine mit einigen Aminosäuren von HNF1 β , möglicherweise zu unnatürlichen Interaktionen mit Elementen führen, die auf unbekannte Weise die Induktion der Apoptose bedingen. In *Xenopus* sind während der Embryonalentwicklung zwei Apoptose induzierende Mechanismen bekannt. Zum einen kann ein maternales Apoptoseprogramm in physiologisch geschädigten Zellen den programmierten Zelltod in der frühen Gastrulation auslösen. Zum anderen gehören Apoptosen zur normalen Embryonalentwicklung und beginnen während der Gastrulation (Hensey und Gautier, 1999). Möglicherweise wird einer dieser Mechanismen durch die Überexpression der HNF1-Proteine HNF1aab, HNF1aabH, HNF1aaa8+9b oder HNF1aa1-7ba (vgl. Abb. 20) ausgelöst.

Die hier beobachtete Letalität beeinträchtigt die Auswertbarkeit der hier gezeigten Ergebnisse sowie die Ergebnisse weiterer möglicher Experimente mit anderen Aminosäureaustauschen, denn zum einen ist die Wahrscheinlichkeit der Embryonen zu Überleben am größten, bei denen die injizierte RNA-Menge niedrig ist, zum anderen bringt dies aber auch einen geringeren Effekt auf die Nierenentwicklung mit sich. Außerdem sind Sekundäreffekte auf die Nierenentwicklung nicht ganz auszuschließen. Daher ist es sinnvoll, Informationen über die Kristallstrukturen zu berücksichtigen. Von HNF1 α ist die Kristallstruktur der Aminosäuren 83-279 bekannt (Chi et al., 2002). Daraus geht hervor, dass die POU-spezifische und die POU-Homeodomäne über einige Aminosäuren eine Berührungsfläche bilden, die durch verschiedene Wechselwirkungen die Struktur von HNF1 α stabilisiert. Die Aminosäure Glutamin an Position 250 und Glutamin an der Position 252 sind an dieser Berührungsfläche beteiligt. In HNF1 β sind an diesen Positionen die Aminosäuren Lysin und Histidin zu finden (Austausche 6 und 7, Tab.4). Diese Austausche verändern möglicherweise die

Interaktionsstärke der POU-spezifischen und der POU Homeodomäne und beeinflussen dadurch evtl. die Konformation und Flexibilität der Pou-Domänen. Es ist bereits gelungen, die Aminosäuresequenz 91 bis 310 von HNF1 β zu kristallisieren (Lu et al., 2006). Sobald Daten zur Molekülstruktur von HNF1 β bekannt sind, kann man anhand des Vergleichs der HNF1 α und HNF1 β Strukturmodelle die Auswirkungen der Aminosäureaustausche 1-7 auf die Molekülstruktur genauer bewerten.

4.2 Suche nach Interaktionspartnern von HNF1 β

4.2.1 Identifikation von HNF1 β Interaktionspartnern mit dem Bacteriomatch-II-Two-Hybrid-System

Zur Suche von Interaktionspartnern von HNF1 β wurde das Bacteriomatch-II-Two-Hybrid System benutzt (Abb. 7). Es wurde in dieser Arbeit verwendet, denn es hat gegenüber dem Hefesystem einige Vorteile. *E. coli* teilt sich schneller als Hefe, ist leichter zu transformieren, und die Gewinnung der DNA ist einfacher. Außerdem ist es in *E. coli* unwahrscheinlicher als in der Hefe, dass Homologe der Interaktionspartner in den Wirtszellen zu finden sind. Es ist im Gegensatz zum Hefe-basierenden Two-Hybrid-System weniger gut etabliert. In Pubmed ist die Anzahl gefundener Interaktionspartner aus einem bakteriellen Two-Hybrid-System sehr gering, während viele Interaktionspartner mit dem Hefesystem gefunden wurden. Die Hefe bringt hingegen den Vorteil mit sich, dass sie im Gegensatz zu *E. coli* zu posttranslationaler Modifikation der Interaktionspartner befähigt ist. Durch mangelnde posttranslationale Modifikation kann es in *E. coli* zu falschpositiven, aber auch zu falschnegativen Ergebnissen kommen. Bei den hier gezeigten Arbeiten wurde durch Verwendung des bakteriellen Two-Hybrid-Systems ein bereits bekannter Interaktionspartner von HNF1 β gefunden, PCBD1, der auch als Dimerisation Cofactor of HNF1 β bezeichnet wird. Das zeigt, dass das BacteriomatchII-Two-Hybrid-System funktioniert und zur Suche weiterer Interaktionspartner geeignet ist. Neben diesem bekannten wurden sechs neue Interaktionspartner von HNF1 β identifiziert, C17orf45, DAK, E4F1, HADH, TRIM26 und ZFP36L1 (Tabelle 6).

4.2.2 Spezifität der Interaktionen

Es wurde getestet, ob die gefundenen Interaktionspartner von HNF1bbb auch mit HNF1aaa interagieren. Dabei stellte sich unter Benutzung des BacteriomatchII-Two-Hybrid-Systems heraus, dass es teilweise starke Unterschiede zwischen HNF1bbb und HNF1aaa bezüglich der Interaktionsstärke mit dem jeweiligen Partner gab (Tab. 6, Abb. 9). Allerdings konnte nicht gezeigt werden, dass Interaktionspartner ausschließlich mit HNF1 β interagierten. Der Grund hierfür könnte der sein, dass HNF1 α nicht posttranslational modifiziert wurde, und sich daraus resultierend nicht so stark von HNF1 β unterschied wie eukaryotisches HNF1 β . Es wurde gezeigt, dass HNF1 α vermutlich eine viel stärkere posttranslationale Modifikation erhält als HNF1 β (Chouard et al., 1997). Das schließen die Autoren daraus, dass HNF1 α im SDS-Gel bei 92-98kDa wandert, obwohl 72-78kDa vorausgesagt wurden. HNF1 β läuft hingegen mit der erwarteten Größe. Außerdem konnte ein monoklonaler Antikörper, der gegen bakteriell hergestelltes HNF1 α gerichtet war, HNF1 α in Nierengewebe der Ratte nicht detektieren, wohl aber HNF1 β . Das weist darauf hin, dass HNF1 β in Rattengewebe nur wenig posttranslationale Modifikation erfährt. HNF1 α wird hingegen anscheinend so stark modifiziert, dass die Antikörper, die gegen bakterielles und daher nicht posttranslational modifiziertes HNF1 α gerichtet sind, es nicht mehr detektieren können. Aus diesem Grund interagieren Interaktionspartner von HNF1 β auch mit bakteriell hergestelltem HNF1 α , würden aber wahrscheinlich nicht mehr mit posttranslational modifiziertem HNF1 α interagieren.

Um die Interaktionen in vitro nachzuweisen, wurden GST-Pull-down Analysen von DAK, E4F1, HADH, TRIM26 und ZFP36L1 durchgeführt (Abb. 11). Mit Ausnahme von DAK konnten die Interaktionen der anderen vier Interaktionspartner mit HNF1aaa und HNF1bbb bestätigt werden. Auch hierzu wurde bakteriell hergestelltes HNF1aaa bzw. HNF1bbb verwendet. Bei diesen Analysen konnte aus oben genanntem Grund ebenfalls kein klarer quantitativer Unterschied der gebundenen Interaktionspartner festgestellt werden. Um die Spezifität genau zu charakterisieren, ist es erforderlich, eine definierte Menge von eukaryotisch hergestelltem HNF1 α und HNF1 β bei einer Coimmunpräzipitation einzusetzen.

4.2.3 Der Interaktionspartner HADH

Im BacteriomatchII-Two-Hybrid-System wurden die Aminosäuren 28-381 von HADH als Interaktionspartner von HNF1bbb identifiziert (Tab. 6). Die Interaktion des HADH in voller Länge mit HNF1bbb ließ sich in GST-Pull-down Analysen bestätigen. Es wurde in *Xenopus*

laevis überexprimiert und die Wirkung auf die Niere untersucht. Es zeigte sich, dass die Überexpression von HADH keinen sichtbaren Einfluss auf die Größe und Morphologie des Pronephros hatte (Abb. 12+13B). Es ist jedoch denkbar, dass die Interaktion des überexprimierten HADH mit dem endogenen HNF1 β Auswirkungen auf die Expression von Zielgenen hatte, die durch die hier durchgeführte Analyse nicht entdeckt wurde. Denn es könnten auch Faktoren beeinflusst worden sein, die weder die Größe noch die Gestalt des Pronephros beeinflussen, zum Beispiel Proteine, die für den Ionentransport verantwortlich sind. In der Datenbank gudmap sind keine Informationen zur Expression von HADH im Urogenitalsystem des Mäusefoetus vorhanden. HADH ist ein kernkodiertes Protein, das im Reich der Eukaryoten konserviert ist. Es ist an der β -Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien beteiligt. Die Defizienz von HADH führt beim Menschen außerdem zu einem erblichen Hyperinsulinismus (Hardy et al., 2007). In Beta-Zellen des Pankreas der Ratte wurde gezeigt, dass HADH stark exprimiert wird, aber im Gegensatz dazu andere Enzyme, die an der Fettsäureoxidation beteiligt sind, schwach exprimiert werden (Martens et al., 2007). Wurde die Expression durch den Einsatz von siRNA vermindert, so erhöhte sich die Insulinausschüttung unabhängig von der Glukosekonzentration. HADH scheint eine Funktion zum Schutz vor zu hoher Insulinausschüttung zu haben. Die genaue Funktion ist jedoch nicht bekannt. Auch HNF1 β hat einen Einfluss auf die Regulation der Insulinausschüttung, allerdings führt eine HNF1 β Defizienz in den β -Zellen des Pankreas zu einer Verringerung der Insulinausschüttung (Wang et al., 2004). Bei HNF1 β -Mutationen im Menschen kommt es zu MODY5 (maturity onset diabetes of the young). Es ist also denkbar, dass durch die Interaktion von HADH und HNF1 β in den β -Zellen des Pankreas eine Regulation des Insulinhaushaltes stattfindet. Dazu sind weitere Untersuchungen in β -Zellen erforderlich. Dazu müsste zunächst geklärt werden, ob HADH in β -Zellen stärker mit HNF1 α oder HNF1 β interagiert, denn auch HNF1 α spielt eine Rolle bei der Insulinausschüttung. Mutationen von HNF1 α im Menschen verursachen MODY3, was sich von MODY5 unterscheidet. Dann könnte die Interaktion genauer charakterisiert und nach einem Zusammenhang bei dem Einfluss auf die Insulinsekretion gesucht werden.

HNF1 β reguliert ein wichtiges Protein in der Fettsäureoxidation, die very long chain acetyl dehydrogenase (VLCAD). Bei HNF1 β Defizienz in der Maus wird VLCAD reduziert gebildet, und es kommt zu einer Anhäufung von Triglyceriden im Blut (Coffinier et al., 2002). Mutationen führen außerdem zu Hypoglykämie, was auch bei Mutationen im HADH-

Gen durch Hyperinsulinismus beobachtet wird. Möglicherweise beeinflusst HNF1 β die Fettsäureoxidation auch durch die Protein-Protein-Interaktion mit HADH.

4.2.4 Der Interaktionspartner TRIM26

TRIM26 wurde im Bacteriomatch-Two-Hybrid-System in zwei unabhängigen Suchen als Interaktionspartner von HNF1bbb identifiziert (Tab.6). In beiden Suchen wurden die Aminosäuren 74-109 gefunden, denn die cDNA beider Klone war genau identisch. Es ist möglich, dass dieser cDNA-Klon in der cDNA Bank überrepräsentiert war und daher zweimal gefunden wurde. In den GST-Pull-down Analysen (Abb. 11) war die Interaktion von TRIM26 mit HNF1aaa oder HNF1bbb nur schwer nachzuweisen. Der Gehalt an Natriumchlorid wurde von 100mM auf 50mM reduziert, da bei 100mM keine Interaktion zu beobachten war. Entweder handelte es sich hier um eine schwache Interaktion, oder der myc-tag am N-terminalen Ende beeinflusste die Interaktion negativ. Die Überexpression von TRIM26 in Embryonen von *Xenopus laevis* beeinflusste die Größe des Pronephros nur sehr gering, auf die Morphologie zeigte sich kein Einfluss (Abb. 12+13C). Die Ergebnisse wiesen nicht auf eine Funktion von TRIM26 während der Pronephrosentwicklung hin. Über die Funktion der TRIM-Proteine ist im Allgemeinen wenig bekannt. TRIM26 enthält eine RING-Domäne und spielt möglicherweise eine Rolle in der Ubiquitinylierung von Proteinen. Eine Konservierung der TRIM-Proteine konnte bisher nur in Säugetieren gezeigt werden (Reymond et al., 2001). Homologe Proteine in niederen Vertebraten sind nicht bekannt. HNF1 β ist hingegen in der Evolution der Vertebraten hoch konserviert und spielt bereits in der Entwicklung des Pronephros, der die einfachste Nierenform darstellt, eine Rolle. Da *Xenopus*-HNF1 β jedoch nicht mit dem menschlichen HNF1 β identisch ist, ist es möglich, dass TRIM26 in *Xenopus* nicht mit HNF1 β interagieren kann und daher die Pronephrosentwicklung nicht beeinflusst. Es ist daher wahrscheinlich, dass die im Two-Hybrid-System gefundene Interaktion von HNF1bbb und TRIM26, die in GST-Pull-down Analysen nur mit verringertem Natriumchlorid-Gehalt bestätigt werden konnte, keine biologische Funktion im Zusammenhang mit der Nierenentwicklung hat. Allerdings ist es möglich, dass TRIM26 erst in der Metanephrosentwicklung eine Rolle spielt. Dies erscheint wahrscheinlich, da es im Mäusefötus 15,5 dpc (days past coitum) exprimiert wird, wie in situ Hybridisierungen der Datenbank www.gudmap.org (gudmap ID 5985) zeigen. Die Expression beschränkt sich allerdings auf die Uretren, in denen keine Expression von HNF1 β in diesem Stadium beobachtet wurde. Das spricht sehr gegen eine biologisch relevante Interaktion in der

Entwicklung, sondern für eine von HNF1 β unabhängige Funktion des TRIM26 während der Entwicklung des Metanephros.

4.2.5 Der Interaktionspartner E4F1

Die Überexpression von E4F1 in *Xenopus* führte zu einer Vergrößerung des Pronephros auf der injizierten Seite (Abb. 12). Diese kam sowohl von verlängerten Tubuli, als auch durch verdickte Tubuli und Ductus zustande (Abb. 13A). Durch in situ Hybridisierungen wurde bewiesen, dass E4F1 im *Xenopus*-Embryo während der Entwicklung ubiquitär exprimiert wird (Abb. 15). Im Schwanzknospenstadium ist ein stärkeres Signal in dem Teil der Pronephrosanlage zu erkennen, aus dem sich im weiteren Entwicklungsverlauf die Tubuli entwickeln. Aufgrund dieser Beobachtung kann vermutet werden, dass E4F1 während der normalen Nierenentwicklung eine Bedeutung hat. E4F1 ist ein Transkriptionsfaktor. Er wurde erstmalig durch seine Interaktion mit E1A induzierbaren Enhancern entdeckt (Lee et al., 1987). Seine Funktion wurde durch Deletion in Mäusen untersucht (Le Cam et al., 2004). Heterozygote Mäuse entwickelten sich normal. Mäuseembryonen mit homozygot deletiertem E4F1 entwickelten sich nicht, sie starben nach der Implantation. Eingehende Untersuchungen ergaben, dass das Fehlen von E4F1 Auswirkungen auf das Fortschreiten der Mitose hatte. Ein großer Anteil der Zellen verblieb in der Prometaphase, in der die Chromosomen bereits kondensiert sind, aber noch nicht in der Metaphasenplatte angeordnet sind. Die Mitose wurde hier am Kontrollpunkt während der Spindelbildung angehalten. Dies geschieht, wenn nicht alle Zentromere mit den Transportfasern der Spindelapparate verbunden sind, und / oder sich die Chromosomen nicht in der Äquatorialebene der Zelle befinden. Außerdem gab es Zellen, bei denen sich einzelne Chromosomen weit außerhalb der Metaphaseplatte befanden. Während der Mitose bindet E4F1 bei Wildtyp-Mäusen an den Spindelapparat. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die Orientierung der Spindelapparate in den sich entwickelnden Tubuli und Ducti entscheidend sind (Fischer et al., 2006). Durch Deletion von HNF1 β ging diese Orientierung verloren, die eine Vergrößerung der Innendurchmesser der Tubuli und Ducti zufolge hatte. Hier ist ein funktioneller Zusammenhang von E4F1 und HNF1 β denkbar, da E4F1 während der Mitose mit dem Spindelapparat assoziiert ist. Um eine derartige Funktion nachzuweisen, wäre es sinnvoll, Dünnschnittpräparate vom sich entwickelnden Pronephros von *Xenopus* oder vom Metanephros der Maus während der Entwicklung herzustellen, um dann durch Immunfluoreszenzen zu untersuchen, ob E4F1 und HNF1 β während der Mitose am Spindelapparat colokalisieren.

Bei Überexpression von E4F1 in Fibroblasten wurde beobachtet, dass tetraploide Zellen und Zellen mit mehreren Nuklei entstanden. Diese waren um ein vielfaches größer als Zellen mit nur einem Nukleus. Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Überexpression von E4F1 in *Xenopus laevis* eine Vergrößerung des Pronephros zufolge hat. Die Vergrößerung kommt möglicherweise nicht durch mehr Zellen, sondern durch vergrößerte Zellen zustande. Hier wurde gezeigt, dass E4F1 und HNF1 β in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293 im Zellkern colokalisieren (Abb. 16). Das war zu erwarten, da sowohl E4F1 (Paul et al., 2006) als auch HNF1 β nukleäre Proteine sind. Es wurde weiterhin gezeigt, dass E4F1 mit BMI1 interagiert (Chagraoui et al., 2006). BMI1 bildet mit anderen Proteinen den Polycomb Komplex, der mit dem Chromatin assoziiert ist und repressorisch auf die Genexpression wirkt (Moehrle und Paro, 1994). Während der Mitose interagieren E4F1 und BMI1 im Zytoplasma, dabei spielt E4F1 möglicherweise eine Rolle bei der Dissoziation von BMI1 vom Chromatin. Möglicherweise findet eine Interaktion zwischen E4F1 und HNF1 β im Zellkern statt, die für die Modulation des Chromatins relevant ist.

Mit Hilfe von Luciferase-Reportersystemen konnte keine direkte Beeinflussung des Transaktivierungspotentials von HNF1 β festgestellt werden, denn E4F1 hemmte die Aktivität des OPN-Promotors und steigerte die Aktivität des Thymidinkinasepromotors mit vier HNF1-Bindestellen (HNF1⁴-tk) bereits ohne Cotransfektion von HNF1 β (Abb. 18). Unter Verwendung des ACE2-Promotors zeigte E4F1 allein keinen Effekt und beeinflusste nicht das Transaktivierungspotential von HNF1 β . Sollte jedoch die biologische Funktion der Interaktion von HNF1 β und E4F1 nicht in der Aktivierung der Transkription bestimmter Gene sein sondern eine andere Funktion wie die Orientierung des Spindelapparates, so wäre kein Effekt auf das Transaktivierungspotential von HNF1 β zu erwarten.

Im menschlichen Genom ist E4F1 90 Kilobasen stromaufwärts vom PKD1-Gen lokalisiert. Dieses ist für polyzystische Nierenerkrankungen verantwortlich. Möglicherweise wurden in der Vergangenheit Defekte des E4F1-Gens fälschlicherweise dem PKD1-Gen zugeordnet, wenn beispielsweise durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit großen Sonden Bruchpunkte im Chromosom 16 dem PKD1-Lokus anstatt dem E4F1-Gen zugeordnet wurden.

4.2.6 Der Interaktionspartner ZFP36L1

Die Überexpression von ZFP36L1 in *Xenopus* Embryonen störte die Entwicklung des Pronephros auf mehreren Ebenen. Während in manchen Tieren ein stark verkleinerter

Pronephros zu finden war, verfügten andere über Pronephri mit Verdickungen der Tubuli und des Ductus. Auch Zystenbildung und zusätzliche Tubuli wurden beobachtet (Abb. 13D). Durch Whole-mount in situ Hybridisierung von *Xenopus* Embryonen wurde gezeigt, dass ZFP36L1 während der Neurulation diffus in der Pronephrosanlage exprimiert wird (Abb. 15). Im Schwanzknospenstadium war eine klar abgegrenzte Expression von ZFP36L1 in der Pronephrosanlage zu sehen, und zwar sowohl in dem Teil, aus dem die Tubuli entstehen, als auch in den Zellen, aus denen der Ductus entsteht. Im umliegenden Gewebe war keine Expression zu detektieren. In *Xenopus* wurde gezeigt, dass ein verwandetes Protein von ZFP36L1, C3H-3b, welches zur gleichen Familie gehört, im umliegenden mesodermalen Gewebe des Pronephros exprimiert wird (Kaneko et al., 2003). Seine Überexpression inhibierte die Pronephrosentwicklung. Auch die Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden, die die Expression von C3H-3b blockierte, führte zu Defekten in der Nierenentwicklung.

ZFP36L1 (auch bezeichnet als Tis11b, BRF1, Berg36, CMG1) gehört zur Tristetraprolinfamilie der Zinkfingerproteine. Zu dieser Familie gehören drei Proteine, deren bekanntester Vertreter das TTP (Tristetraprolin, auch bezeichnet als ZFP36) ist. Das dritte Protein ist ZFP36L2, das auch Tis11d genannt wird. ZFP36L1 ist im Reich der Vertebraten konserviert. Alle drei Proteine sind Phosphoproteine. Sie können vom Zellkern zum Zytoplasma translokalisieren. Dazu verfügen sie über ein Nuklear-Export-Signal (NES). Es befindet sich bei TTP am N-Terminus, bei ZFP36L1 und ZFP36L2 am C-Terminus (Phillips et al., 2002). Das Nuklear-Import-Signal befindet sich bei TTP und ZFP36L1 innerhalb der Tandem-Zinkfingerdomäne, die für die RNA-Bindung verantwortlich ist. Auch bei Zerstörung der Fähigkeit, RNA zu binden, bleibt das Nuklear-Import-Signal erhalten. Eine bekannte Funktion dieser Zinkfingerproteine ist die Degradation von mRNA (Blackshear et al., 2002). Sie binden mit der Tandem-Zinkfingerdomäne an AU-reiche Elemente im 3'-untranslatierten Ende einer mRNA und vermitteln ihren Abbau. Die N-terminale Domäne von TTP und ZFP36L1 interagiert mit dem Deadenylierungsenzym hCcr4, mit zwei Untereinheiten des Decapping-Komplexes sowie einer 5'-3' Exonuklease (Lykke-Andersen et al., 2005). Die C-terminale Domäne interagiert hingegen nicht mit RNA-abbauenden Enzymen. Das wurde durch Coimmunpräzipitation gezeigt. Um zu klären, welche Domäne wie stark am mRNA-Abbau beteiligt ist, wurden die einzelnen Domänen mit dem MS2-Hüllprotein fusioniert. Anhand einer β -Globin-mRNA, die sechs β -Globin-Bindestellen am 3'-untranslatierten Ende trug, wurde die mRNA-abbauende Aktivität getestet. Es stellte sich heraus, dass die N-terminale Domäne den Abbau der mRNA vermitteln konnte, aber auch die C-terminale Domäne, obwohl sie nicht mit RNA-abbauenden Enzymen interagieren kann. Ein

weiterer Faktor wird vermutlich mit dem C-Terminus von ZFP36L1 interagieren und die Fähigkeit zum RNA-Abbau vermitteln, indem es diese rekrutiert. Auch HNF1 β interagiert mit dem C-Terminus von ZFP36L1, denn im bakteriellen Two-Hybrid-System wurde nur der C-terminale Teil gefunden. Es ist daher möglich, dass HNF1 β in diesem Zusammenhang den Abbau von mRNA vermitteln kann. Darüber ist jedoch bisher nichts bekannt. Es wurde hier jedoch nicht untersucht, ob HNF1 β den von ZFP36L1 vermittelten RNA-Abbau beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ZFP36L1 mit HNF1 β im Zellkern colokalisiert oder ob der Überschuss des einen Proteins die Lokalisation des anderen beeinflusst. Dazu wurden HEK 293 Zellen mittels confokaler Mikroskopie untersucht. Es zeigte sich in allen Experimenten, dass HNF1 β sich im Zellkern aufhielt und ZFP36L1 zytosolisch war. Gelegentlich konnte eine Überlappung an der Kernmembran beobachtet werden (Abb. 17). Trotz der zytosolischen Lokalisation von ZFP36L1 zeigte sich bei Experimenten mit Luciferasereportersystemen in HEK 293 Zellen, dass ZFP36L1 einerseits die Aktivität des OPN-Promotors hemmt, außerdem aber in der Lage ist, die Transaktivierung des Thymidin-Kinase-Promotors mit vier HNF1-Bindestellen durch HNF1 β zu reduzieren (Abb. 19). Diese Reduktion beruhte höchstwahrscheinlich auf einer Interaktion, denn ZFP36L1 hatte allein keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Das beweist außerdem, dass die Reduktion der Transaktivierung kein Resultat des mRNA-Abbaus der Luciferase-mRNA sein kann. Des weiteren zeigt es, dass ZFP36L1 hier eine Kernfunktion hat, denn die Transkription der Luciferase-mRNA findet im Zellkern statt. Vom verwandten Protein TTP ist bekannt, dass es auf die Transkription eine repressorische Funktion hat, obwohl auch dieses zytoplasmatisch ist. Es wurde anhand von Luciferase-Reportersystemen gezeigt, dass TTP in der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 einen suppressiven Effekt auf die Aktivität des TNF-Promotors, des Interleukin-8-Promotors und des Thymidin-Kinase-Promotors hat (Zhu et al., 2001). Dieser Effekt wurde aufgehoben, wenn die Zellen mit Lipopolysaccharid stimuliert wurden. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich der, dass TTP durch die LPS-Stimulation vollständig ins Zytoplasma wandert. Außerdem wurde die zelluläre Lokalisation von TTP in diesen Zellen mit und ohne LPS sowie unter Serumententzug untersucht (Taylor et al., 1996). Bei allen Experimenten war TTP nur in der zytosolischen Fraktion zu finden. Trotzdem zeigte es in den Versuchen von Zhu eine Repressorfunktion auf die Promotoraktivität einiger getesteter Gene. Vermutlich reichte dazu eine Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze im Zellkern aus, die aber nach Zugabe von LPS nicht mehr im Zellkern vorhanden war. Auch bei dem hier untersuchten eng verwandten ZFP36L1 ist es möglich, dass eine Proteinmenge

unterhalb der Nachweisgrenze im Zellkern war, die die Aktivität des Thymidin-Kinase-Promotors mit den HNF1-Bindestellen durch Interaktion mit HNF1 β in den Luciferasereportersystemen beeinflussen konnte.

Es wurde gezeigt, dass die Expression von TTP in NIH/3T3 Zellen durch Serumstimulation induziert werden konnte. In diesen Zellen war TTP 2h nach der Induktion zu gleichen Anteilen in der nukleären und in der zytosolischen Fraktion zu finden (Taylor et al., 1996). TTP ist folglich auch bei Serumzugabe nicht ausschließlich zytosolisch. Das verstärkt die Vermutung, dass auch das eng verwandte ZFP36L1 bei Serumzugabe teilweise im Zytoplasma lokalisiert sein kann.

In der Maus wurde ZFP36L1 homozygot deletiert (Stumpo et al., 2004). Ein Phänotyp basierend auf der heterozygoten Deletion von ZFP36L1 wurde nicht beschrieben. Die homozygote Deletion führte dazu, dass das Chorion und die Allantois in zwei Dritteln der untersuchten Embryonen nicht fusionierte, wodurch die Embryonen starben. In den überlebenden Embryonen zeigte sich, dass die Plazenta nicht korrekt ausgebildet war. Außerdem war das Neuralrohr fehlentwickelt, in dem am weitesten entwickelten Embryo zeigte sich, dass das Gehirn fehlorganisiert war. Die abdominalen Organe waren unterentwickelt, was aber möglicherweise durch die Unterversorgung der Embryonen aufgrund der Fehlentwicklung der Plazenta zustande kam. Es lässt sich daher aus diesem Modell keine Rolle von ZFP36L1 in der Entwicklung ableiten. In Organen von Wildtyp-Mäusen wurden Transkripte von ZFP36L1 mittels Northern Blot nachgewiesen. In der adulten Maus wird ZFP36L1 in den Nieren, im Herzen, in der Lunge, in der Milz sowie in den Ovarien stark exprimiert.

Es wurde gezeigt, dass ZFP36L1 VEGF (vascular endothelial growth factor) mRNA degradiert (Ciais et al 2004, Bell et al 2006). Das kann zur Fehlentwicklung der Niere führen, denn die Vaskularisierung ist essentiell für die Nierenentwicklung.

4.2.7 HNF1 β , E4F1 und ZFP36L1 in der Metanephrosentwicklung

Sowohl für E4F1 als auch für ZFP36L1 konnte gezeigt werden, dass sie während der Entwicklung der Xenopus Embryonen in der Pronephrosanlage exprimiert werden. Ihre Überexpression störte die Entwicklung des Pronephros, was sich sowohl durch die Veränderung der Größe als auch der Morphologie bemerkbar machte. Zwar ist weder von E4F1 noch von ZFP36L1 etwas über die Expression in der menschlichen Niere bekannt,

jedoch die Datenbank www.gudmap.org gibt Aufschluss über ihr Expressionsmuster im foetalen Metanephros der Maus.

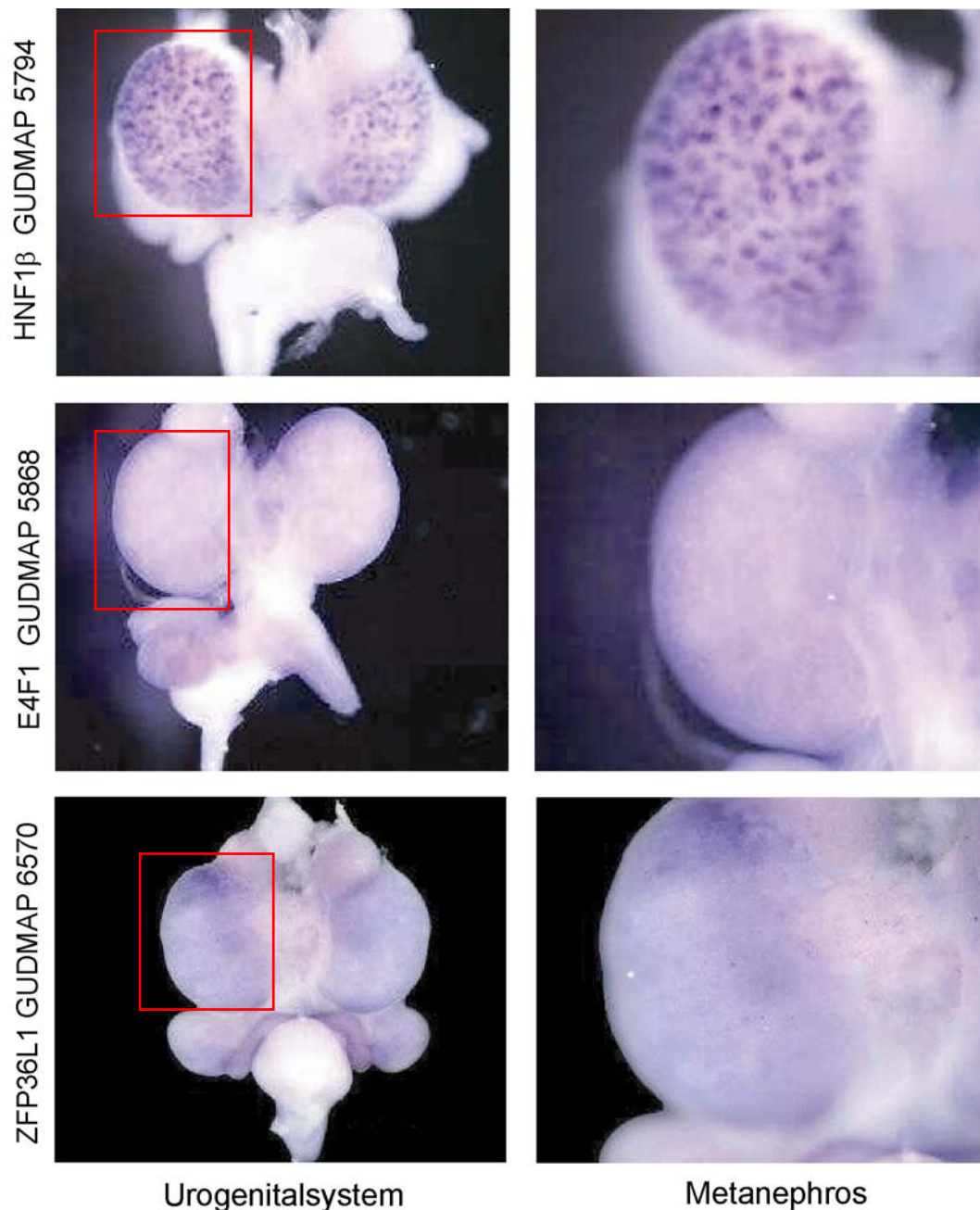


Abb. 21: Nachweis von HNF1 β , E4F1 und ZFP36L1 im Urogenitalsystem von Mäuseföten, 15,5 dpc (days past coitum), mittels in situ Hybridisierung aus der Datenbank www.gudmap.org. Links sind die nachgewiesenen Transkripte und die entsprechenden Nummern der Datenbankeinträge angegeben, unten die gezeigten Organe. Auf der linken Seite ist jeweils das gesamte Urogenitalsystem zu sehen, bei dem einer der paarig angelegten Metanephri durch ein rotes Rechteck markiert ist. Dieser Metanephros ist jeweils links vergrößert abgebildet.

In den Metanephri der Maus sind HNF1 β , E4F1 und ZFP36L1 exprimiert. Allerdings unterscheiden sie sich in ihrem Expressionsmuster im Metanephros. Neben den hier gezeigten

Fotographien enthält die Datenbank gudmap Listen, aus denen zu entnehmen ist, in welchen Zelltypen des Metanephros die Expression detektiert wurde. HNF1 β wird nach den dort zur Verfügung gestellten Daten nur in den Tubuli stark exprimiert. Dadurch kommen die punktförmigen Anfärbungen als Nachweise der HNF1 β -Transkripte zustande (Abb. 21 oben). Auch E4F1 und ZFP36L1 werden in den Tubuli des Metanephros des Mäusefötus exprimiert. Dort ist also eine Interaktion in den Zellen möglich. Darüber hinaus werden E4F1 und ZFP36L1 außerdem im Mesenchym, in der Ureterspitze, im Interstitium und der Vaskulatur exprimiert. Daher zeigen die Metanephri, bei denen die Transkripte von E4F1 und ZFP36L1 nachgewiesen wurden, eine gleichmäßige bläuliche Färbung (Abb. 21 Mitte und unten).

E4F1 und ZFP36L1 kommen also infrage für „congenital anomalies of the kidney and urinary tract“ kurz CAKUT verantwortlich zu sein. Das konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht hinreichend geklärt werden. Von beiden Genen sind keine Mutationen im Menschen bekannt, die dies belegen würden. Bingham et al haben in einer Kooperation das ZFP36L1 Gen von 58 Patienten sequenziert, die unter Fehlentwicklungen der Niere mit ungeklärter Ursache litten (unveröffentlicht). In keiner Probe konnte eine Mutation von ZFP36L1 festgestellt werden. Dafür kann es mehrere Gründe geben: Die Expression kann durch epigenetische Ereignisse beeinflusst werden, die nicht erfasst wurden, oder die Mutation ist nur selten zu finden. Ein weiterer Grund dafür könnte sein, dass die Expression von ZFP36L1 für die Fusion von Chorion und Allantois enorm wichtig ist. Möglicherweise können selbst heterozygote Mutationen im Menschen schon zum Tod des Embryonen in der frühen Schwangerschaft führen, sodass diese möglicherweise nicht bemerkt und der Grund des Aborts nicht näher untersucht werden kann, obwohl dies in der Maus nicht beobachtet wurde. Auch heterozygot deletiertes HNF1 β verursacht bei der Maus keinen Phänotyp, während es beim Menschen zu einer Vielzahl von Fehlentwicklungen führt.

E4F1 von diesen Patienten wurde bisher nicht sequenziert, da es sich aus 14 Exons zusammensetzt und die Sequenzierung sehr arbeitsintensiv ist. Auch hier findet man keine Hinweise auf Mutationen im Menschen. Der Grund dafür könnte ebenfalls sein, dass eine heterozygote Mutation im Menschen letal ist, da E4F1 für den Fortgang der Mitose elementar ist.

Um die Rolle von E4F1 und ZFP36L1 in der Metanephrosentwicklung näher zu beleuchten, wäre es sinnvoll, Experimente mit Nierenkulturen der Maus durchzuführen. Damit war es bereits möglich, die Rolle von Wt1, Pax2 und VegF und Gdnf während der frühen Metanephrosentwicklung zu charakterisieren (Gao et al., 2005). Dazu wurden aus Mausembryonen im Stadium E (embryonic day) 11.5 die Metanephrosanlagen isoliert und auf

Nitrozellulosemembranen unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Expressionsvektoren wurden per Elektroporation eingebracht. Die Auswirkungen der überexprimierten Proteine konnten durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Durch einen Cytokeratin-Antikörper konnte der sich verzweigende Ureter markiert werden, durch einen Lotus-Lektin-Antikörper wurden die Tubuli markiert, und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Ein solches System ist geeignet, um Proteine zu identifizieren, die die Metanephrosentwicklung in einem sehr frühen Stadium beeinflussen, nämlich bei der Verzweigung der Ureterspitze und der Induktion der Nephronbildung.

5 Zusammenfassung

Die Homeodomäne des Transkriptionsfaktors HNF1 β ist eines der drei Elemente, die die Nephrogenese in *Xenopus* beeinflussen. Der eng verwandte Transkriptionsfaktor HNF1 α beeinflusst die Nephrogenese hingegen nicht. Seine Homeodomäne unterscheidet sich nur in neun Aminosäuren von der HNF1 β Homeodomäne. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bereits zwei HNF1 β -typische Aminosäuren im C-terminalen Bereich der Homeodomäne ausreichend sind, einem HNF1 α -Protein diese Wirkung auf die Nephrogenese zu verleihen. Ein HNF1 α -Protein erhält auch dann eine Wirkung auf die Nephrogenese, wenn die weiter N-terminalen sieben Aminosäuren β -typisch sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Interaktionspartner von HNF1 β gesucht. HNF1 β gehört zu der Gruppe von Genen, die für erblich bedingte Fehlbildungen des Urogenitalsystems verantwortlich sind (=CAKUT. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract). Somit kamen seine Interaktionspartner während der Nierenentwicklung als Kandidaten für weitere „CAKUT“-Gene in Frage. Mit einem bakteriellen Two-Hybrid-System wurde der bekannte Interaktionspartner DCoH sowie sechs neue Interaktionspartner in einer humanen foetalen Nieren-cDNA-Bank gefunden und die Interaktion für die Proteine E4F1, HADH, TRIM26 und ZFP36L1 mit HNF1 β durch GST-pull-down Analysen bestätigt. Ihre biologische Funktion wurde anhand ihrer Überexpression in *Xenopus laevis* untersucht. Die Überexpression von E4F1 oder ZFP36L1 resultierte sowohl in einer Größenveränderung des Pronephros, als auch in einer Veränderung seiner Morphologie. Die Überexpression von HADH und TRIM26 zeigten dagegen keinen klaren Einfluss auf die Pronephrosentwicklung. Durch in situ Hybridisierung in *Xenopus* Embryonen zeigte sich, dass E4F1 ubiquitär exprimiert wurde, während des Schwanzknospenstadiums war aber ein verstärktes Signal in der Anlage der Nierentubuli sichtbar. ZFP36L1 wurde bereits im Neurulastadium diffus im Bereich der Pronephrosanlage exprimiert, im Schwanzknospenstadium war eine Expression in der Pronephrosanlage klar nachzuweisen. Es wurde außerdem gezeigt, dass E4F1 und HNF1 β im Zellkern von HEK293 Zellen colokalisieren. ZFP36L1 war hingegen überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, während sich HNF1 β im Kern aufhielt. Mit Hilfe von Luciferasereportersystemen wurde gezeigt, dass ZFP36L1 das Transaktivierungspotential von HNF1 β reduziert. Dieser Effekt wurde unter Verwendung des Thymidin-Kinasepromotors mit vier HNF1-Bindestellen beobachtet und ist höchstwahrscheinlich auf die Protein-Protein-Interaktion von HNF1 β und ZFP36L1 zurückzuführen. Für E4F1 konnte kein eindeutiger

Effekt auf das Transaktivierungspotential von HNF1 β gezeigt werden. E4F1 und ZFP36L1 scheinen somit durch Interaktion mit HNF1 β an der Nierenentwicklung beteiligt zu sein und könnten somit „CAKUT“-Gene darstellen.

6 Literaturverzeichnis

Amiel,J., Audollent,S., Joly,D., Dureau,P., Salomon,R., Tellier,A.L., Auge,J., Bouissou,F., Antignac,C., Gubler,M.C., Eccles,M.R., Munnich,A., Vekemans,M., Lyonnet,S., and ttie-Bitach,T. (2000). PAX2 mutations in renal-coloboma syndrome: mutational hotspot and germline mosaicism. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 820-826.

Asashima,M., Ariizumi,T., and Malacinski,G.M. (2000). In vitro control of organogenesis and body patterning by activin during early amphibian development. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 126, 169-178.

Bach,I., Mattei,M.G., Cereghini,S., and Yaniv,M. (1991). Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res.* 19, 3553-3559.

Bach,I. and Yaniv,M. (1993). More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J.* 12, 4229-4242.

Barbacci,E., Reber,M., Ott,M.O., Breillat,C., Huetz,F., and Cereghini,S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 126, 4795-4805.

Beckers,D., Bellanne-Chantelot,C., and Maes,M. (2007). Neonatal cholestatic jaundice as the first symptom of a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene (HNF-1beta). *J. Pediatr.* 150, 313-314.

Bell,S.E., Sanchez,M.J., Spasic-Boskovic,O., Santalucia,T., Gambardella,L., Burton,G.J., Murphy,J.J., Norton,J.D., Clark,A.R., and Turner,M. (2006). The RNA binding protein Zfp3611 is required for normal vascularisation and post-transcriptionally regulates VEGF expression. *Dev. Dyn.* 235, 3144-3155.

Bellanne-Chantelot,C., Chauveau,D., Gautier,J.F., Dubois-Laforgue,D., Clauin,S., Beaufils,S., Wilhelm,J.M., Boitard,C., Noel,L.H., Velho,G., and Timsit,J. (2004). Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann. Intern. Med.* 140, 510-517.

Bellanne-Chantelot,C., Clauin,S., Chauveau,D., Collin,P., Daumont,M., Douillard,C., Dubois-Laforgue,D., Dusselier,L., Gautier,J.F., Jadoul,M., Laloi-Michelin,M., Jacquesson,L., Larger,E., Louis,J., Nicolino,M., Subra,J.F., Wilhem,J.M., Young,J., Velho,G., and Timsit,J. (2005). Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. *Diabetes* 54, 3126-3132.

Biggin,M.D. and Tjian,R. (1989). Transcription factors and the control of Drosophila development. *Trends Genet.* 5, 377-383.

Blackshear,P.J. (2002). Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 945-952.

- Blumenfeld,M., Maury,M., Chouard,T., Yaniv,M., and Condamine,H. (1991). Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* 113, 589-599.
- Bohn,S., Thomas,H., Turan,G., Ellard,S., Bingham,C., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2003). Distinct molecular and morphogenetic properties of mutations in the human HNF1beta gene that lead to defective kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2033-2041.
- Boulikas,T. (1994). Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. *J. Cell Biochem.* 55, 32-58.
- Buratowski,S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77, 1-3.
- Cereghini,S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10, 267-282.
- Cereghini,S., Blumenfeld,M., and Yaniv,M. (1988). A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev.* 2, 957-974.
- Ceska, T.A., Lamers, M., Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R., and Suck, D. (1993). The X-ray structure of an atypical homeodomain present in the rat liver transcription factor LFB1/HNF1 and implications for DNA binding. *EMBO J.* 12, 1805-1810.
- Chagraoui,J., Niessen,S.L., Lessard,J., Girard,S., Coulombe,P., Sauvageau,M., Meloche,S., and Sauvageau,G. (2006). E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells. *Genes Dev.* 20, 2110-2120.
- Chi,Y.I., Frantz,J.D., Oh,B.C., Hansen,L., Dhe-Paganon,S., and Shoelson,S.E. (2002). Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1alpha. *Mol. Cell* 10, 1129-1137.
- Chouard,T., Jeannequin,O., Rey-Campos,J., Yaniv,M., and Traincard,F. (1997). A set of polyclonal and monoclonal antibodies reveals major differences in post-translational modification of the rat HNF1 and vHNF1 homeoproteins. *Biochimie* 79, 707-715.
- Ciais,D., Cherradi,N., Bailly,S., Grenier,E., Berra,E., Pouyssegur,J., Lamarre,J., and Feige,J.J. (2004). Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene* 23, 8673-8680.
- Coffinier,C., Gresh,L., Fiette,L., Tronche,F., Schutz,G., Babinet,C., Pontoglio,M., Yaniv,M., and Barra,J. (2002). Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* 129, 1829-1838.
- Coffinier,C., Thepot,D., Babinet,C., Yaniv,M., and Barra,J. (1999b). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* 126, 4785-4794.
- Coffinier,C., Barra,J., Babinet,C., and Yaniv,M. (1999a). Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech. Dev.* 89, 211-213

- Demartis,A., Maffei,M., Vignali,R., Barsacchi,G., and De,S., V (1994). Cloning and developmental expression of LFB3/HNF1 beta transcription factor in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 47, 19-28.
- Deryckere,F., Byrnes,L., Wagner,A., McMorro,T., and Gannon,F. (1995). Salmon HNF1: cDNA sequence, evolution, tissue specificity and binding to the salmon serum albumin promoter. *J. Mol. Biol.* 247, 1-10.
- Drewes,T., Senkel,S., Holewa,B., and Ryffel,G.U. (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol. Cell Biol.* 16, 925-931.
- Dukes,I.D., Sreenan,S., Roe,M.W., Levisetti,M., Zhou,Y.P., Ostrega,D., Bell,G.I., Pontoglio,M., Yaniv,M., Philipson,L., and Polonsky,K.S. (1998). Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 273, 24457-24464.
- Edghill,E.L., Bingham,C., Ellard,S., and Hattersley,A.T. (2006). Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J. Med. Genet.* 43, 84-90.
- Eller,P., Kaser,S., Lhotta,K., Edghill,E.L., Ellard,S., Ebenbichler,C., and Patsch,J.R. (2007). Renal cysts and diabetes due to a heterozygous HNF-1beta gene deletion. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, 1271-1272.
- Evan,G.I., Lewis,G.K., Ramsay,G., and Bishop,J.M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.* 5, 3610-3616.
- Fischer,E., Legue,E., Doyen,A., Nato,F., Nicolas,J.F., Torres,V., Yaniv,M., and Pontoglio,M. (2006). Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat. Genet.* 38, 21-23.
- Frain,M., Swart,G., Monaci,P., Nicosia,A., Stampfli,S., Frank,R., and Cortese,R. (1989). The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* 59, 145-157.
- Gao,X., Chen,X., Taglienti,M., Rumballe,B., Little,M.H., and Kreidberg,J.A. (2005). Angioblast-mesenchyme induction of early kidney development is mediated by Wt1 and Vegfa. *Development* 132, 5437-5449.
- Gehring,W.J. (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science* 236, 1245-1252.
- Giordano,A. and Avantaggiati,M.L. (1999). p300 and CBP: partners for life and death. *J. Cell Physiol* 181, 218-230.
- Goodman,R.H. and Smolik,S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 14, 1553-1577.
- Gresh,L., Fischer,E., Reimann,A., Tanguy,M., Garbay,S., Shao,X., Hiesberger,T., Fiette,L., Igarashi,P., Yaniv,M., and Pontoglio,M. (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J.* 23, 1657-1668.
- Hansen,L.P. and Crabtree,G.R. (1993). Regulation of the HNF-1 homeodomain proteins by DCoH. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 246-253.

- Hardy,O.T., Hohmeier,H.E., Becker,T.C., Manduchi,E., Doliba,N.M., Gupta,R.K., White,P., Stoeckert,C.J., Jr., Matschinsky,F.M., Newgard,C.B., and Kaestner,K.H. (2007). Functional genomics of the beta-cell: short-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase regulates insulin secretion independent of K⁺ currents. *Mol. Endocrinol.* 21, 765-773.
- Haumaitre,C., Barbacci,E., Jenny,M., Ott,M.O., Gradwohl,G., and Cereghini,S. (2005). Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 1490-1495.
- Haumaitre,C., Fabre,M., Cormier,S., Baumann,C., Delezoide,A.L., and Cereghini,S. (2006). Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1beta/MODY5 mutations. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2363-2375.
- Haumaitre,C., Reber,M., and Cereghini,S. (2003). Functions of HNF1 family members in differentiation of the visceral endoderm cell lineage. *J. Biol. Chem.* 278, 40933-40942.
- Hensley,C. and Gautier,J. (1999). Developmental regulation of induced and programmed cell death in *Xenopus* embryos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 887, 105-119.
- Hiesberger,T., Shao,X., Gourley,E., Reimann,A., Pontoglio,M., and Igarashi,P. (2005). Role of the hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) C-terminal domain in Pkhd1 (ARPKD) gene transcription and renal cystogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 10578-10586.
- Horikawa,Y., Iwasaki,N., Hara,M., Furuta,H., Hinokio,Y., Cockburn,B.N., Lindner,T., Yamagata,K., Ogata,M., Tomonaga,O., Kuroki,H., Kasahara,T., Iwamoto,Y., and Bell,G.I. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat. Genet.* 17, 384-385.
- Jones,E.A. (2005). *Xenopus*: a prince among models for pronephric kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 313-321.
- Kaneko,T., Chan,T., Satow,R., Fujita,T., and Asashima,M. (2003). The isolation and characterization of XC3H-3b: a CCCH zinc-finger protein required for pronephros development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 566-572.
- Kessel,M. and Gruss,P. (1990). Murine developmental control genes. *Science* 249, 374-379.
- Klinke,R. and Silbernagl,S. (1994). *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme-Verlag.
- Klug,A. (1999). Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J. Mol. Biol.* 293, 215-218.
- Kobayashi,A., Kwan,K.M., Carroll,T.J., McMahon,A.P., Mendelsohn,C.L., and Behringer,R.R. (2005). Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* 132, 2809-2823.
- Kuhl,M. (2002). Non-canonical Wnt signaling in *Xenopus*: regulation of axis formation and gastrulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 243-249.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Le, CamL., Lacroix, M., Ciemerych, M.A., Sardet, C., and Sicinski, P. (2004). The E4F protein is required for mitotic progression during embryonic cell cycles. *Mol. Cell Biol.* 24, 6467-6475.
- Lee, K.A. and Green, M.R. (1987). A cellular transcription factor E4F1 interacts with an E1a-inducible enhancer and mediates constitutive enhancer function in vitro. *EMBO J.* 6, 1345-1353.
- Lindner, T.H., Njolstad, P.R., Horikawa, Y., Bostad, L., Bell, G.I., and Sovik, O. (1999). A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2001-2008.
- Lu, P., Li, Y., Gorman, A., and Chi, Y.I. (2006). Crystallization of hepatocyte nuclear factor 1beta in complex with DNA. *Acta Crystallograph. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62, 525-529.
- Lykke-Andersen, J. and Wagner, E. (2005). Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev.* 19, 351-361.
- Martens, G.A., Vervoort, A., Van de, C.M., Stange, G., Hellemans, K., Van Thi, H.V., Schuit, F., and Pipeleers, D. (2007). Specificity in beta cell expression of L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, short chain, and potential role in down-regulating insulin release. *J. Biol. Chem.* 282, 21134-21144.
- Mendel, D.B., Hansen, L.P., Graves, M.K., Conley, P.B., and Crabtree, G.R. (1991a). HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev.* 5, 1042-1056.
- Melton, D.A. (1991). Pattern formation during animal development. *Science* 252, 234-241.
- Moehrle, A. and Paro, R. 1994. Spreading the silence: Epigenetic transcriptional regulation during *Drosophila* development. *Dev. Genet.* 15 478-484.
- Nakanishi, K. and Yoshikawa, N. (2003). Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Pediatr. Int.* 45, 610-616.
- Narayana, N., Hua, Q., and Weiss, M.A. (2001). The dimerization domain of HNF-1alpha: structure and plasticity of an intertwined four-helix bundle with application to diabetes mellitus. *J. Mol. Biol.* 310, 635-658.
- Nielsen, D.A. and Shapiro, D.J. (1986). Preparation of capped RNA transcripts using T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 14, 5936.
- Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1975). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Publishing Co).
- Pabo, C.O. and Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 1053-1095.

- Paul,C., Lacroix,M., Iankova,I., Julien,E., Schafer,B.W., Labalette,C., Wei,Y., Le,C.A., Le,C.L., and Sardet,C. (2006). The LIM-only protein FHL2 is a negative regulator of E4F1. *Oncogene* 25, 5475-5484.
- Phillips,R.S., Ramos,S.B., and Blackshear,P.J. (2002). Members of the tristetraprolin family of tandem CCCH zinc finger proteins exhibit CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling. *J. Biol. Chem.* 277, 11606-11613.
- Pogge von Strandmann,E., Senkel,S., and Ryffel,G.U. (2000). Ectopic pigmentation in *Xenopus* in response to DCoH/PCD, the cofactor of HNF1 transcription factor/pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase. *Mech. Dev.* 91, 53-60.
- Pontoglio,M, Sreenan,S, Roe,M, Pugh,W, Ostrega,D, Doyen,A, Pick,AJ, Baldwin ,A, Velho G, Froguel,P, Levisetti,M,Bonner-Weir,S, Bell GI, Yaniv,M, Polonsky,KS (1998) Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 101, 2215–2222.
- Pontoglio,M., Barra,J., Hadchouel,M., Doyen,A., Kress,C., Bach,J.P., Babinet,C., and Yaniv,M. (1996). Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84, 575-585.
- Pontoglio,M., Prie,D., Cheret,C., Doyen,A., Leroy,C., Froguel,P., Velho,G., Yaniv,M., and Friedlander,G. (2000). HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* 1, 359-365.
- Reymond,A., Meroni,G., Fantozzi,A., Merla,G., Cairo,S., Luzzi,L., Riganelli,D., Zanaria,E., Messali,S., Cainarca,S., Guffanti,A., Minucci,S., Pelicci,P.G., and Ballabio,A. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20, 2140-2151.
- Rose,R.B., Bayle,J.H., Endrizzi,J.A., Cronk,J.D., Crabtree,G.R., and Alber,T. (2000). Structural basis of dimerization, coactivator recognition and MODY3 mutations in HNF-1alpha. *Nat. Struct. Biol.* 7, 744-748.
- Rosengarten,S. Untersuchung der Expressionsmuster verschiedener Pronephrosmarker in der Whole Mount In Situ Hybridisierung in *Xenopus laevis*. (2006) Bachelorarbeit im Institut für Zellbiologie, Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie, Uniklinikum Essen.
- Ryffel,G.U. (2001). Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 11-29.
- Ryffel,G.U. (2003). What can a frog tell us about human kidney development. *Nephron Exp. Nephrol.* 94, e35-e43.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. (Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Schott, O., Billeter, M., Leiting, B., Wider, G., and Wuthrich, K. (1997). The NMR solution structure of the non-classical homeodomain from the rat liver LFB1/HNF1 transcription factor. *J. Mol. Biol.* 267, 673–683.

- Senkel,S., Lucas,B., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (2005). Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1731, 179-190.
- Sive,H., Grainger,R.M., and Harland,R.M. (2000). Early Development of *Xenopus laevis*, A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Stumpo,D.J., Byrd,N.A., Phillips,R.S., Ghosh,S., Maronpot,R.R., Castranio,T., Meyers,E.N., Mishina,Y., and Blackshear,P.J. (2004). Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Mol. Cell Biol.* 24, 6445-6455.
- Sun,Z., Amsterdam,A., Pazour,G.J., Cole,D.G., Miller,M.S., and Hopkins,N. (2004). A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development* 131, 4085-4093.
- Sun,Z. and Hopkins,N. (2001). vhnf1, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev.* 15, 3217-3229.
- Taylor,G.A., Thompson,M.J., Lai,W.S., and Blackshear,P.J. (1996). Mitogens stimulate the rapid nuclear to cytosolic translocation of tristetraprolin, a potential zinc-finger transcription factor. *Mol. Endocrinol.* 10, 140-146.
- Tena,J.J., Neto,A., de,I.C.-M., Bras-Pereira,C., Casares,F., and Gomez-Skarmeta,J.L. (2007). Odd-skipped genes encode repressors that control kidney development. *Dev. Biol.* 301, 518-531.
- Uliniski,T., Lescure,S., Beaufile,S., Guigonis,V., Decramer,S., Morin,D., Clauin,S., Deschenes,G., Bouissou,F., Bensman,A., and Bellanne-Chantelot,C. (2006). Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 497-503.
- Vignali,R., Poggi,L., Madeddu,F., and Barsacchi,G. (2000). HNF1(beta) is required for mesoderm induction in the *Xenopus* embryo. *Development* 127, 1455-1465.
- Vize,P.D., Jones,E.A., and Pfister,R. (1995). Development of the *Xenopus* pronephric system. *Dev. Biol.* 171, 531-540.
- Vize,P.D., Seufert,D.W., Carroll,T.J., and Wallingford,J.B. (1997). Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev. Biol.* 188, 189-204.
- Wang,L., Coffinier,C., Thomas,M.K., Gresh,L., Eddu,G., Manor,T., Levitsky,L.L., Yaniv,M., and Rhoads,D.B. (2004). Selective deletion of the Hnf1beta (MODY5) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release. *Endocrinology* 145, 3941-3949.
- Weber,S., Moriniere,V., Knuppel,T., Charbit,M., Dusek,J., Ghiggeri,G.M., Jankauskiene,A., Mir,S., Montini,G., Peco-Antic,A., Wuhl,E., Zurowska,A.M., Mehls,O., Antignac,C., Schaefer,F., and Salomon,R. (2006). Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2864-2870.

- Welham,S.J., Riley,P.R., Wade,A., Hubank,M., and Woolf,A.S. (2005). Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. *Physiol Genomics* 22, 48-56.
- Wild,W., Pogge von,S.E., Nastos,A., Senkel,S., Lingott-Frieg,A., Bulman,M., Bingham,C., Ellard,S., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2000). The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1beta inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4695-4700.
- Woolf,A.S. (2006). Renal hypoplasia and dysplasia: starting to put the puzzle together. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2647-2649.
- Wu,G., Bohn,S., and Ryffel,G.U. (2004). The HNF1beta transcription factor has several domains involved in nephrogenesis and partially rescues Pax8/lim1-induced kidney malformations. *Eur. J. Biochem.* 271, 3715-3728.
- Zhu,W., Brauchle,M.A., Di,P.F., Gram,H., New,L., Ono,K., Downey,J.S., and Han,J. (2001). Gene suppression by tristetraprolin and release by the p38 pathway. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 281, L499-L508.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. phil nat. Gerhart Ryffel für die Überlassung dieses Themas, sowie die ständige Gesprächsbereitschaft und konstruktive Kritik.

Nima Mottalebi danke ich für seine engagierte Mitarbeit bei der Suche nach Interaktionspartnern von HNF1 β im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit.

Magdalena Roose und Stefan Rosengarten danke ich sehr für praktische Hinweise zur Durchführung der Whole mount in situ Hybridisierung der Xenopusembryonen.

Herrn PD Ludger Klein-Hitpass danke ich für wissenschaftliche Anregungen im Arbeitsgruppenseminar.

Mein besonderer Dank gilt Sabine Senkel und Gülüzar Turan für ihre Unterstützung bei technischen Fragen zu jeder Zeit.

Guizhi Wu danke ich dafür, dass sie mir den Umgang mit *Xenopus laevis* und die RNA-Injektion in *Xenopus*-Embryonen sowie die Immunfluoreszenz der Pronephri näher gebracht hat.

David Nickol danke ich für die Pflege der adulten *Xenopus laevis*.

Der gesamten Arbeitsgruppe III des Instituts für Zellbiologie danke ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und den freundschaftlichen Umgang. Die schöne Zeit in dieser Gruppe wird mir sicher noch lange in Erinnerung bleiben.

Meinem Lebensgefährten Marcus Peters danke ich für die liebevolle Unterstützung in den letzten Jahren.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich stets in meinem Werdegang unterstützt haben.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Karin Dudziak
Geburtsdatum: 30. Januar 1978
Geburtsort: Haltern am See, Deutschland
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

SCHULAUSSBILDUNG

1984 - 1988: Freiherr von Eichendorff Grundschule, Haltern am See
1988 - 1997: Städtisches Gymnasium Haltern
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

BERUFSAUSBILDUNG

10/1997 - 11/2002: Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
09/2001 – 07/2002: Diplomarbeit am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie,
Arbeitsgruppe Immunologie, Medizinische Fakultät, Ruhr-Universität
Bochum, Prof. Dr. F.W. Falkenberg; Thema: “Versuche zur Induktion
von zytotoxischen und humoralen Immunantworten mit Hilfe von
Depotzytokinen und anderen Adjuvantien.”
12.11.2002: Abschluss: Diplom-Biologin
Seit 01/2004: Promotion am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen
in der Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie von Prof. Dr. Gerhart U.
Ryffel

BERUFSERFAHRUNG

04/2003-12/2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Allgemeinen, insbesondere
Experimentellen Pathologie, Medizinische Fakultät, Ruhr-Universität
Bochum

Essen, den 18.09.2007

(Karin Dudziak)